VOLUMEN 11 ABRIL - JUNIO 1958 NUMERO 2

# Microbiología Española

publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

N.Y.
BAH
M.M.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 1960

## CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. D. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. D. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.


---

## SUMARIO


Págs.

Un virus poliédrico en *Stilpnotia salicis* (L.) (Lepidoptera *Lymantriidae)*, por *Miguel Rubio-Huertos* y *Joaquín Templado* ... 93

Detección de antibióticos en leche, sobre siluetas de papel de filtro impregnado, por *A. Portolés* ... ... ... ... ... ... ..... ... ... 99

La reacción P/H y su valor para el diagnóstico de las fases del virus gripal, por *L. Albaladejo y G.ª Berenguer*... ..... ... 119

Titulación del virus de la poliomielitis S. K. New Haven, por *L. Albaladejo y G.ª Berenguer* ... ... ... ... ... ... ... ... ... 135

Determinación de anticuerpos fijadores del complemento en sueros de conejos inmunizados con virus antivariólico, por *M.ª del Rosario de Zuazo Aguirre* ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... 149

Control microbiológico de conservas vegetales, por *Pedro Alonso Carrión* ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... 165

El Premio "Franco", de Ciencias ... ... ... ... ... ... ... ... ... 197

Congresos de Microbiología en Méjico... ... ... ... ... ... ... ... 197

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

# UN VIRUS POLIEDRICO EN *STILPNOTIA SALICIS* (L.) (LEPIDOPTERA, *LYMANTRIIDAE)*

POR

MIGUEL RUBIO-HUERTOS y JOAQUÍN TEMPLADO

*Stilpnotia salicis* (L.) (foto 1) constituye, en su fase larvaria (foto 2), una plaga importante de los chopos, álamos y sauces.

Hasta ahora no se había descrito ningún virus que afectase a este insecto, pero desde la primavera de 1957 hemos encontrado repetidas veces, en los chopos de la Ciudad Universitaria (Madrid), orugas de *S. salicis* que presentaban síntomas de estar atacadas por virus: las orugas colgaban flácidas, agarradas con sus patas abdominales a la corteza del tronco. Se hicieron con algunas de ellas preparaciones que, examinadas al microscopio, mostraron que se trataba de una poliedrosis, la cual ha podido ser transmitida a orugas sanas, criadas en insectario.

Una descripción sumaria del virus causante de la enfermedad, su infectividad, localización en el cuerpo del insecto, etc., constituyen el tema de esta breve nota.

## MATERIAL Y METODOS

Las larvas de *S. Salicis* utilizadas en esta investigación fueron recogidas en la primavera del año pasado en chopos muy atacados (foto 3) de la Ciudad Universitaria, y se instalaron en insectario para seguir su desarrollo. Mientras *S. salicis* presenta al aire libre dos generaciones al año en los alrededores de Madrid, en el laboratorio se consigue parcialmente una tercera.

La fuente del virus fué una oruga infectada, recogida en el mismo lugar que las anteriores; de ella se obtuvieron los poliedros puros por centrifugación fraccionada.

Con los poliedros purificados se inocularon por vía parenteral larvas nacidas en insectario, y a otra serie de estas larvas se les suministraron los poliedros en una suspensión con las hojas de chopo que constituían su alimento.

Los poliedros fueron observados al microscopio electrónico, primero, directamente, y segundo, tras disolución de la proteína del poliedro con carbonato cálcico al 10 %, durante una hora, seguida de centrifugación y suspensión en agua destilada para poder observar el virus. Las preparaciones se sombrearon con paladio. El microscopio electrónico empleado fué el R-C-A, modelo 1946, del Instituto "Daza de Valdés", de Optica, del C. S. I. C. de Madrid (*). Los cortes histológicos hechos según la técnica de impregnación e inclusión en parafina, se tiñeron por diferentes métodos de tinción: hematoxilina de Delafield, floxina, Giemsa, etc., obteniéndose los mejores resultados con el método de Giemsa.

## RESULTADOS

De las larvas infectadas por vía bucal, el 95 por 100 resultaron infectadas, muriendo al cabo de 8-12 días de típica virosis. De las infectadas por vía parenteral, casi todas murieron, pero algunas de ellas creemos que lo fueron más bien por la herida producida al inyectarles el virus.

La aparición de típicas inclusiones de tipo poliédrico fué observada en las larvas infectadas; estas inclusiones se encuentran localizadas en los núcleos de las células del tejido graso de las larvas (foto 4), constituyendo, por lo tanto, una clara poliedrosis nuclear.

Los poliedros son de tamaño irregular y varían en sus dimensiones desde 1,5 a 3,5 micras; su forma es también irregular.

La observación, por medio del microscopio electrónico, de los poliedros intactos y disueltos ha mostrado que el virus tiene forma de bastoncillo y está contenido, formando paquetes de varias partículas, en una membrana o cápsula, varios de estos paquetes de partículas están

(*) Nos complacemos en dar aquí las gracias al Dr. Fernando Catalina, Jefe de la Sección de Microscopia electrónica, del Instituto "Daza de Valdés", de Optica, por su ayuda técnica.

a su vez englobados en una matriz proteínica, sin membrana externa, que constituye la mayor parte de la inclusión poliédrica (foto 5).

Por las características antedichas este virus parece un representante típico de los virus poliédricos del grupo Borrelina.

## SUMMARY

A typical polihedral disease of the larva of *Stilpnotia salicis* (L.) is described.

The polyhedra are of irregular shape and vary in size from about 1,5 — 3,5 microns. They are formed within the nuclei of the fat tissue cells.

A suspension of dissolved in 0,1 sodium carbonate polyhedra washed in distilled water was observed under the electron microscope. Showing that the virus is rod shaped and occurs in bundles surrounded by a membrane. Several of these bundles are imbedded in a proteinic matrix forming the polyhedral inclusion body.

## BIBLIOGRAFIA

AGENJO, R. 1957. Monografía de las especies españolas de la familia *Lymantriidae* Hampson, 1892, con especial referencia a las de interés forestal. Graellsia, 15: 5-144.

BERGOLD, G. H. 1953a. On the nomenclature and classification on insect viruses. Ann. N. Y. Acad. Sci., 56: 495-516.

BERGOLD, G. H. 1953b. Insect viruses. Advances virus research. I. Acad. Press. N. Y.

HOLMES, F. O. 1948. Order virales, the filterable viruses. In Bergey's manual of determinative bacteriology. 6th ed. Williams Wilkins, Baltimore.

SMITH, K. M. 1955. Morphology and development of insect viruses. Advances in virus research. III. Acad. Press. N. Y.

STEINHAUS, E. A. 1949. Principles of insect pathology. McGraw-Hill Book Company Inc. N. Y.

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/international-microbiology_april-june-1958_11_2

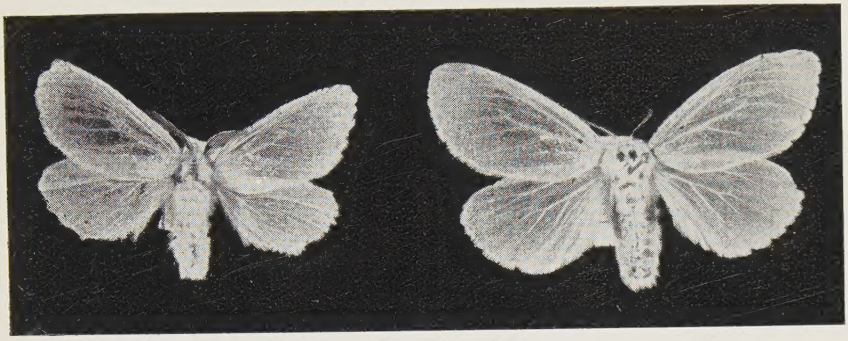

Foto 1.
*Stilpnotia salicis* (L.): mariposas macho y hembra.

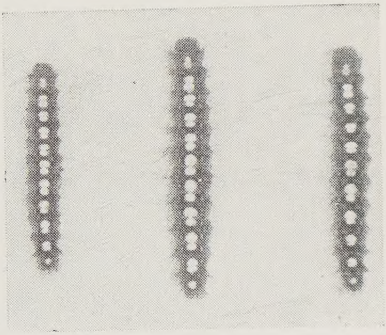

Foto 2.
*S. salicis:* orugas.

Foto 3.
Estado de los árboles atacados por *S. salicis.*

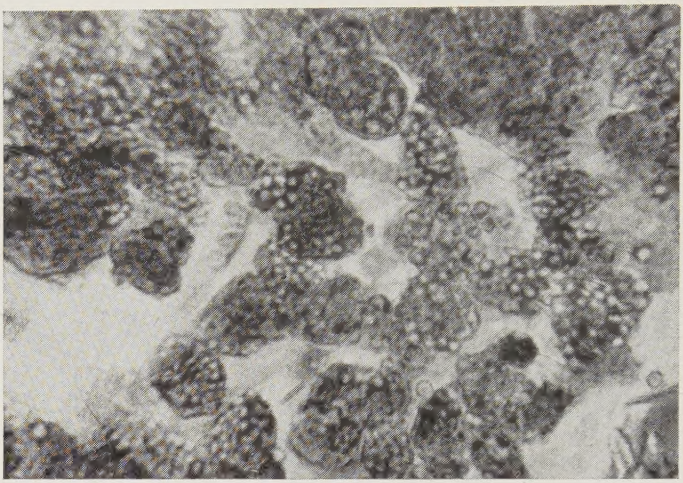

FOTO 4.

Sección a través del cuerpo graso de la larva infectada de *S. salicis;* nótense los poliedros refringentes llenando los núcleos. Tinción Giemsa.

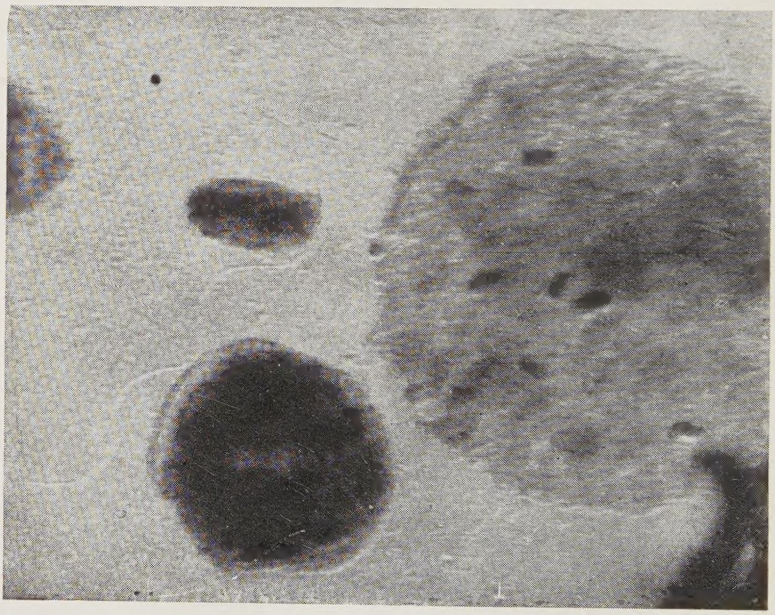

FOTO 5.

Poliedros parcialmente disueltos y una bacteria contaminante. En uno de los poliedros se observan las cápsulas que contienen las partículas de virus. Microscopio electrónico. X 20.000.

*C. S. I. C.*
*INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA*
*SECCION DE BIOLOGIA MICROBIANA*

# DETECCION DE ANTIBIOTICOS EN LECHE, SOBRE SILUETAS DE PAPEL DE FILTRO IMPREGNADO

POR

A. PORTOLÉS

Al revisar brevemente la terapéutica más eficaz, preconizada en los casos de mastitis de vacas lecheras, nos encontramos que las soluciones tópicas con 250 U. de penicilina/cc., que, en principio (1947), se usaron en EE. UU., han variado, de acuerdo con la aparición —cada día más frecuente— de cepas antibiótico-resistentes; así, antes no se creía necesario tratamiento parenteral, que más tarde fué, sin embargo, recomendado con pautas aproximadas de 100.000 U. durante cuatro días sucesivos. Para esta introducción bibliográfica en busca de antecedentes que nos lleven al conocimiento de la terapia de las mastitis y presencia de antibióticos en leche, se han consultado los trabajos de Florestano y Bahler (21) y los de Dierhofer (17), quienes demuestran que los antibióticos más utilizados con estos fines son penicilina y estreptomicina, aunque en ocasiones se recomienden pomadas de cloromicetina al 2 %, inyecciones intramusculares diarias de un gramo de terramicina u otros antibióticos; los de Richou y Thieulin (48), referentes a lo rápido, a la vez que efímero de su acción, debido a su pronta eliminación, hecho que no evita los problemas de antibiótico-resistencias (Alford, Heljo y Mc Croy (1), ni de limitación en la capacidad de producción hasta 1/3 de lo normal (Blackburn (8).

De la eliminación de antibióticos por la leche y sus consecuencias de inhibición en los microorganismos de tipo láctico, se han ocupado: Harmon (28) en Texas, Bryan (11) en Michigan y Johns (30) en Otawa, así como Calbert (12), Berridge (5) y Obiger (42) relacionan las incidencias de estos antibióticos con las interferencias que pudieran provocar en la fabricación de mantequilla y queso. Welch, Jester y Bur-

ton (62) determinan las concentraciones en muestras de leche de dieciséis regiones de EE. UU., las cuales oscilan de 0,03 a 0,8 U/cc., en tanto que para Grecue y Bell es de 10 p. p. m.; Schipper (51) hace también estas determinaciones, pero sobre muestras de tejidos de diversas partes de las glándulas mamarias, para comprobar su difusión.

La otra causa responsable de la presencia de sustancias antibióticas en leche puede ser su posible empleo como agente conservador, según lo demuestran las experiencias de Grecue y Bell (27) y los amplios trabajos de Ray (47) y Tollenaar y Mossel (59).

Respecto a posibles fenómenos de sensibilización en personas enfermas por consumo de leche con antibióticos, existen teorías contradictorias; por una parte Welch y cols. defienden la inocuidad de estas dosis de antibióticos, frente a las opiniones de Bryan, de un lado, y de Stoltz y Hankinson (54) de otro, quienes encontraron que personas sometidas experimentalmente durante cinco días consecutivos a la administración de 500 c. c. de leche que contenía estreptomicina o aureomicina (50 mgrs. y 125 mgrs., respectivamente), sufren los efectos de disfunción en las bacterias coliformes del tramo intestinal; sin embargo, estas mismas experiencias resultaron negativas para la penicilina, aun cuando sí se produjeron algunos casos de alteraciones intestinales administrando 50 U./cc. diarias, durante quince días, o 500 U./cc. durante cinco días.

No es de extrañar, por tanto, que la presencia de antibióticos en leche cree un gran problema en los establecimientos sanitarios, según afirman Nutting y Barber (41) y Krienke (33), y que Calbert solicite intervención legal que obligue a descartar la leche procedente de seis ordeños consecutivos al cese del tratamiento por antibióticos.

Respecto a los efectos de los antibióticos sobre la microflora de la leche y productos lácteos en general, encontramos en primer lugar, la publicación de Stoltz y Hankinson (55) referentes a los fenómenos de inhibición sobre "starters" lácticos; más tarde Wilkowske y Krienke (65) observan esto mismo en populaciones bacterianas lácticas, y Angelotti, Weiser y cols. (2), sobre otras cepas más comunes. También estudia el efecto de bajas concentraciones de penicilina sobre "starters" para la producción de quesos Berridge (7), mientras que Galesloot (22) hace parecidas experiencias sobre el yogourt, y otros investigadores, entre ellos Claybauh y Welson (13), Stoltz y Hankinson (56), Pedersen y

Moller-Madsen (44) y algunos más, hacen interesantes trabajos de revisión sobre el efecto de los antibióticos en leche.

Por otra parte, Churchill y cols. (16) proponen el uso de la prueba de la fosfatasa de Stoltz-Hankinson, para enjuiciar de la calidad de la leche, sin que exista interferencia postantibióticos; Thome (58), Wilkowse y Krienke (66), y Whitehead y Lane (64) estudian los efectos de los antibióticos para la fabricación de quesos y las variaciones en la calidad de los mismos, en tanto que Rohrlich y Essner (49) observan los desequilibrios del cociente de fermentación ácido láctico/ácido acético, paralelos a los desequilibrios entre bacterias y levaduras por la aparición de antibióticos.

En cuanto a los antecedentes acerca de la dosificación de antibióticos en leche, hemos encontrado gran número de trabajos (35, 61, 60, 36, 7, 18) basados en cultivos sobre medio láctico de cepas sensibles, para comprobar después de la incubación si se produce coagulación de la leche; otros (45, 41, 40, 23) valoran la presencia de estas sustancias inhibidoras por la cantidad de ácido láctico producido en condiciones análogas a las anteriores o mediante pruebas de reducción, y Mossel (39) lo hace, también sobre medio líquido, pero utilizando un sencillo método gasométrico. También puede determinarse la concentración de antibiótico en leche sobre medio sólido, según se demuestra por la técnica "des cupules" de Jacquets y Steeg (29) y por otras sobre discos de papel impregnado (31, 52, 24).

Al hacer un bosquejo histórico de los métodos que para la investigación de antibióticos se fundan en técnicas de papel impregnado, nos encontramos con que, desde los ensayos de Morley (38) y O'Toole (43) sobre la posibilidad de determinación de sensibilidad a los antibióticos por medio de discos de papel impregnados, hasta las técnicas más recientes de Bondi, Spaulding, Smith y Dietz (9), Gould y Bowie (26), Goldin y Sohn (25) y Fusillo y Kuhns (21 b), han sido unos cuantos los investigadores que se han ocupado de este asunto: Kolmer, Spaulding y Robinson (32) describen minuciosamente su técnica sobre discos de papel, mientras que Sweeney, Davis y Barnes (57), Christensen y Lipsett (15), Arnold y Lett (3), Pike, Schulze y Mac Cullough (46), Lind y Swanton (37) y Broom, Martineau y Young (10), publican diferentes trabajos en los que se dan los resultados de pruebas de sensibilidad para distintos antibióticos con varios microorganismos. Ello de-

muestra que, al menos para las exigencias de la Clínica, estas técnicas han dado buenos resultados.

Mientras Ericson, Hogman y Wikman (20) hacen un estudio completo de los diferentes factores que influyen sobre las zonas de inhibición, y Balows y Barber (4) comparan los métodos sobre discos convencionales, otros autores aportan procedimientos que tienden a mejorar las técnicas, así: Dudani y Ahuja (19) utilizan, en la preparación de las soluciones acuosas para impregnar una determinada cantidad de acetona, con el fin de que la desecación sea favorecida; Laszlo y Szabo (34) siguen el método clásico, pero empleando el asa espiralada de Takatsy para micrométodos serológicos, a fin de conseguir una mayor exactitud en las diluciones de una curva "standard", y Cooper (14) estudia la teoría de las zonas de inhibición sobre el agar.

Métodos sobre silueta múltiple son el de Scherr (50), para diferentes antibióticos y el presentado por nosotros en colaboración con el Profesor Socias (53) para asociaciones de antibióticos, que es el que ha dado origen a la presente Memoria que aquí se resume.

Al hacer una visión de conjunto sobre cuanto llevamos dicho, de forma que resuma brevemente los diferentes aspectos de la cuestión, llegamos a lo que se puede considerar *estado actual del problema:*

*a)* Las vacas lecheras son tratadas por antibióticos (con inyecciones intramamarias frecuentemente) para combatir la mastitis producidas por diversos gérmenes; estos antibióticos son eliminados en la leche durante los cinco días subsiguientes al tratamiento. Por otra parte, se han efectuado algunos ensayos con vistas a utilizar estas sustancias como agentes conservadores en la leche y productos lácticos, y aquí tenemos los dos posibles orígenes de estas sustancias inhibidoras en leche.

*b)* Los antibióticos que con mayor frecuencia se utilizan para estos fines, son: penicilina, estreptomicina y aureomicina, aunque a veces se encuentran citados también la terramicina, tetraciclina, bacitracina u otros, que son estudiados a este respecto más como vía de ensayo que como problema real.

*c)* Las dosis citadas por los diferentes autores oscilan de 0,03 U. a 0,8 U. de penicilina/cc. y de 0,01 a 0,7 mgr. de estreptomicina o aureomicina/cc.

*d)* La actividad que estas concentraciones de antibióticos en leche ejercen sobre los seres humanos es muy dicutida, ya que si bien unos

autores opinan que no son capaces de provocar perjuicio alguno, otros están de acuerdo en mantener la idea de que la leche en estas condiciones puede ser la causa de hipersensibilizaciones a estas sustancias, de desequilibrios en la flora intestinal u otros trastornos.

*e)* Todos los autores están de acuerdo, sin embargo, con que la presencia de estas sustancias en la leche crea una serie de problemas en la industria lechera, que se pueden resumir, en función de sus efectos, del siguiente modo:

1. Inhibición de las bacterias durante el almacenamiento de la leche (a 7° C. durante cuarenta y ocho horas), provocando confusiones al juzgarla según "standard" biológicos.
2. Influyen directamente en los "tests" de reducción.
3. Inhiben el metabolismo y desarrollo de los "starters" lácticos.
4. Modifican la morfología y características de la flora de las leches ácidas.
5. La sensibilidad de los fermentos lácticos a los antibióticos usuales se traduce por una enfermedad de "egouttage" de los quesos o una acidificación insuficiente de las cremas.
6. Perturban las fermentaciones mixtas de bacterias y levaduras, modificando el cociente de fermentación, ya que inhiben el crecimiento bacteriano y mejoran aparentemente el levaduriforme.

*f)* Es necesario un control de estas sustancias en los productos lácticos. Este análisis puede efectuarse por métodos químicos y biológicos.

*g)* Entre los métodos biológicos puede haberlos con intervención de reacciones químicas, procedimientos físicos de medida o típicamente microbiológicos. En nuestra opinión todas las ventajas pertenecen, por ahora, a los métodos microbiológicos propiamente dichos, por lo que proponemos esta nueva técnica sobre papel de filtro en silueta múltiple, con las ventajas que se indicarán más adelante.

## PARTE EXPERIMENTAL

En ella se expondrán los ensayos o experiencias que nos conducirán al establecimiento de las características y condiciones de desarrollo de la técnica que preconizamos como útil para la investigación de antibióticos en leche. Antes, hemos creido oportuno practicar pruebas con el método clásico, para así mejor establecer diferencias o enjuiciar sobre su utilidad:

1) *Comprobación del método clásico de los discos de papel impregnado.*

Mediante discos de papel cortado con un taladracorchos y dispuestos sobre placas de Petri, que previamente tenían una capa de medio base y a continuación se le añadió la capa de siembra, según técnica corriente, hemos realizado ensayos para la detección de antibióticos, impregnando estos discos con muestras de leche. Después se incubaron las placas así preparadas, a 37° C. durante diez y seis horas, al cabo de las cuales se hizo la lectura de resultados.

En primer lugar, preparamos muestras de leche con concentraciones de antibiótico comprendidas dentro de las habituales dadas por algunos autores y, posteriormente, a la vista de los resultados, fuimos modificando según los halos que se obtenían.

Los resultados de estos ensayos se resumen en el cuadro 1.

CUADRO 1

| Ensayos | Concentración de la muestra | Gotas/disco | Halos de inhibición en mm. | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Penicilina | Estreptomicina | Aureomicina |
| I | 0.05 U/c. c. penic. . . | I | — | — | — |
| | 5 γ/c. c. estr. y aur. . | II | — | — | — |
| | | III | — | — | — |
| II | 0,1 U/c. c. penic. . . . | I | — | — | — |
| | 10 γ/c. c. estr. y aur. | II | — | — | — |
| | | III | — | — | — |
| III | 0,5 U/c. c. penic. . . . | I | — | — | ± |
| | 50 γ/c. c. estr y aur. | II | — | — | ± |
| | | III | — | — | + |
| IV | 1 U/c. c. penic. . . . . | I | 0 | 10,5 | 16,5 |
| | 50 γ/c. c. estr. y aur. | II | 14,5 | 16 | 18 |
| | | III | 24 | 25,5 | 27,5 |

De donde se deduce que este método requiere trabajar con concentraciones mayores del antibiótico en leche, de las que habitualmente se encuentran, o bien, impregnar con mayores cantidades, utilizando varios discos..., ¿por qué no utilizar entonces la silueta múltiple, que tiene las ventajas por nosotros apuntadas en el trabajo correspondiente? (53).

En la respuesta a este interrogante examinaremos diferentes detalles técnicos que nos sirvan para la adaptación de la técnica citada a los procedimientos del laboratorio de análisis lactológico.

## II) *Adaptación de la técnica en silueta múltiple.*

Ya en nuestro primer trabajo referente a este método (53) hicimos las oportunas consideraciones acerca de las diferentes variables a tener en cuenta antes de desarrollar una técnica de este tipo. No pretendemos examinar aquí el porqué de cada decisión en el "modus operandi", ya que para precisar los fundamentos de esta técnica se remite al trabajo citado.

Los gérmenes *utilizados* en estos ensayos han sido: *Staphylococcus aureus,* cepa Londres, *Escherichia coli,* cepa N. C. T. C. 86 Oxford y *Bacillus subtilis* var. *niger.*

Los *antibióticos* utilizados son: penicilina G. sódica crist. Merck (1.667 O. U./mgr.); dihidroestreptomicina, sulfato Merck (800 gam/mgr.), y aureomicina, clorhidrato Lederle (1.000 gam/mgr.).

Las *escalas de dilución* utilizadas son de dos tipos: unas pertenecen a los ensayos experimentales y otras a la técnica propiamente dicha, y lo mismo podemos decir de las *cantidades a impregnar* en las siluetas utilizadas. Las concentraciones que se hacen intervenir en estas experiencias son calculadas de acuerdo con los antecedentes bibliográficos y algunos ensayos experimentales previos, de acuerdo con las concentraciones más frecuentemente encontradas en las muestras de leche, y las variaciones que éstas pueden sufrir según el momento de la toma y dosificación terapéutica a que esté sometido el animal. Con los antibióticos y agua destilada estéril se prepararon soluciones madre de 400 U/cc. de penicilina, 1.000 gam/cc. de dihidroestreptomicina y 1.000 gam/cc. de aureomicina, a partir de las cuales y con leche descremada, esterilizada

y previamente sometida a la investigación de sustancias inhibidoras (*), se establecen las diluciones según el cuadro 2.

CUADRO 2

| Antibióticos | Concentraciones/c. c. |
|---|---|
| Penicilina U/c. c. . . . . | 4 — 2 — 1 — 0,5 — 0,25 — 0,2 — 0,1 — 0,05 — 0,025 — 0,012 |
| Estreptomicina y aureomicina γ/c. c. . . | 500 — 250 — 125 — 62,5 — 50 — 25 — 12,5 — 6,25 — 3,12 |

De estas diluciones, a cada porción correspondiente de silueta, se le añade con todo cuidado, mediante jeringuilla apropiada, las cantidades que se precisan según las condiciones del ensayo, que oscilan de 0,02 a 0,1 c. c. y con lo cual las concentraciones de antibiótico alcanzadas para cada disco oscilan según las diferentes diluciones desde 0,4 a 0,008 U/cc. para la penicilina y desde 50 a 0,3 gam/cc. para estreptomicina y aureomicina.

Para las *pruebas de antibiogramas,* se depositan con rapidez y cuidadosamente, las siluetas previamente preparadas, se incuban a 37° C. durante catorce a dieciséis horas, al cabo de las cuales se puede hacer la *lectura de resultados.*

III) *Protocolo experimental para el desarrollo de la técnica.*

Para llegar a los datos definitivos sobre los gérmenes, diluciones y concentraciones más idóneas para el mejor desarrollo de la técnica, es preciso examinar por separado las distintas variables a considerar: *a),* en cuanto a la idoneidad del germen a emplear; *b),* en cuanto a la dilución de la siembra; *c),* en cuanto a las concentraciones de los antibióticos en las muestras de leche, y *d),* en cuanto a las concentraciones de antibiótico por disco y las cantidades a impregnar.

En cada experiencia se dispusieron tres placas para cada uno de los

(*) Esta leche, empleada para las diluciones, se hirvió previamente, al objeto de privarla de una actividad bacteriana de la lactenina (Bergamini (4 b), Auclair y Portmann (3 b)).

tres antibióticos ensayados, a fin de comprobar: el comportamiento de los tres tipos de gérmenes indicados, capacidad de las dosis de impregnación y las concentraciones experimentales del antibiótico en leche. Todo ello en cinco series de experiencias, cada una para diez concentraciones diferentes por sustancia y repetidas tres veces, con un total de 165 ensayos, cuyos datos nos conducen a los resultados finales, que son resumidos en el cuadro 3, y que es obligado tener en cuenta antes de empezar los ensayos definitivos.

CUADRO 3

| Antibióticos | Gérmenes ensayados | Dosis límite de impregnación | Halos límites encontrados — mm. | Concentración límite apreciable de sensibilidad/c. c. de leche |
|---|---|---|---|---|
| Penicilina ..... | *Staphilococcus*.. | 0,02 U/disco. | 11,5-16,5 | 0,5 U/c. c. |
| | *B. subtilis*..... | 0,01-0,02 U/d. | 11 -19 | 0,25 U/c. c. |
| Estreptomicina . | *Staphilococcus*.. | 2,5 γ/disco. | 11-17 | 500 γ/c. c. |
| | *E. coli*..... | 1,5 γ/disco. | 11-25 | 25 γ/c. c. |
| | *B. subtilis*..... | 0,5 γ/disco. | 11-27,5 | 12.5 γ/c. c. |
| Aureomicina. .. | *Staphilococcus*.. | 2,5-5 γ/disco. | 9-11 | 250 γ/c. c. |
| | *E. coli*..... | 0,25 γ/disco. | 12-25,5 | 25 γ/c. c. |
| | *B. subtilis*..... | 0,06 γ/disco. | 14-31 | 3 γ/c. c. |

Como observaciones complementarias al cuadro que precede y que resumen definitivamente el estado del problema que se plantea, tenemos:

*a)* El *B. subtilis* var. *niger* es, de los tres gérmenes ensayados, el que produce respuestas de inhibición mejor controlables, capaces de poder seriar en una gráfica de trayectoria casi regular, teniendo además la ventaja de ser aprovechable para los tres antibióticos.

*b)* No existe comparación posible entre los halos producidos por las mismas conc./disco, cuando varían las cantidades de impregnación.

*c)* Es necesario, por tanto, fijar exactamente las condiciones de trabajo y repetir éstas con precisión a fin de obtener resultados comparables dentro de un mismo antibiótico, que, por otra parte, tendrán diferentes dosis mínimas eficaces de impregnación (Penicilina = 0,1 cc.; estreptomicina = 0,08 cc.; aureomicina = 0,02 cc.).

En cuanto a la dilución del inóculo, podemos decir que hemos com-

probado que los mejores resultados se obtienen interponiendo en el medio que se emplea para capa de siembra, 2 c. c. de una suspensión en sol. salina estéril con, aproximadamente, 200 millones de bacterias/cc. Inóculos de menor riqueza pueden perturbar la lectura de resultados, mientras que si sobrepasan esta concentración, pueden vencer las debilísimas inhibiciones provocadas por las concentraciones más pequeñas de las muestras ensayadas.

También creemos oportuno advertir que la carga de los discos se hace tanto más cómoda y fácilmente cuanto mayor es el grado de sequedad en las siluetas, evitando al mismo tiempo una mayor difusión de los líquidos.

IV) *Ensayos definitivos de respuesta gradual de halos de inhibición.*

A la vista de los resultados anteriormente conseguidos, y una vez fijadas las mejores condiciones para obtener buenos resultados, se establecen experiencias con vistas a conseguir halos que reflejen —dentro de la limitación biológica del método— la concentración aproximada de sustancias inhibidoras de crecimiento bacteriano que la leche posea. Así, valiéndonos de dos siluetas múltiples para cada antibiótico, se ensayaron, según nuestra técnica, las diferentes muestras de leche, en las condiciones experimentales y con los resultados que se indican en el cuadro 4.

Este grupo de ensayos definitivos nos ha permitido: 1), hacer una mayor fragmentación de las impregnaciones (con./disco) para seguir observando con cierta regularidad la gradual respuesta del diámetro del halo a la concentración del antibiótico; 2), comprobar una vez más la influencia de la cantidad de líquido impregnada en iguales o muy parecidas conc./disco, y 3), que las pequeñas conc./disco producen halos de tamaños irregulares, que no guardan la proporcionalidad que parece observarse con dosis superiores a 0,5 U. de penicilina o a 8 gam. de estreptomicina/disco, mientras que la aureomicina sigue produciendo siempre halos más uniformes.

También tuvimos ocasión de comprobar que las siluetas impregnadas y desecadas, conservan invariables su actividad a temperaturas de 2° a 0° C. durante veinticinco dias como mínimo, mientras que períodos de tiempo superiores a treinta o más días provocan irregularidades en el tamaño de los halos.

CUADRO 4

| | Muestra conc./c. c. | Cantidad impregnada | Conc./disco | Halo en mm. |
|---|---|---|---|---|
| PENICILINA | 0,1 U. | 0,08<br>0,1 | 0,008<br>0,01 | ±<br>13,5 |
| | 0,2 U. | 0,08<br>0,1 | 0,016<br>0,02 | 10<br>15 |
| | 0,4 U. | 0,08<br>0,1 | 0,032<br>0,04 | 12<br>18 |
| | 0,6 U. | 0,08<br>0,1 | 0,048<br>0,06 | 10,5<br>18,5 |
| | 0,8 U. | 0,08<br>0,1 | 0,064<br>0,08 | 11<br>19 |
| | 1 U. | 0,08<br>0,1 | 0,08<br>0,1 | 16<br>21 |
| | 1,2 U. | 0,08<br>0,1 | 0,096<br>0,12 | 18<br>22,5 |
| | 1,4 U. | 0,08<br>0,1 | 0,104<br>0,14 | 19<br>23 |
| | 1,6 U. | 0,08<br>0,1 | 0,112<br>0,16 | 19,5<br>24 |
| | 1,8 U. | 0,08<br>0,1 | 0,12<br>0,18 | 21,5<br>25 |
| ESTREPTOMICINA | 10 γ. | 0,06<br>0,08 | 0,6<br>0,8 | ±<br>18,5 |
| | 20 γ. | 0,06<br>0,08 | 1,2<br>1,6 | 16,5<br>23,5 |
| | 40 γ. | 0,06<br>0,08 | 2,4<br>3,2 | 13<br>24 |
| | 80 γ. | 0,06<br>0,08 | 4,8<br>6,4 | 18<br>23,5 |
| | 120 γ. | 0,06<br>0,08 | 7,2<br>9,6 | 19<br>23 |
| | 160 γ. | 0,06<br>0,08 | 9,6<br>12,8 | 22,5<br>27 |
| | 200 γ. | 0,06<br>0,08 | 12<br>16 | 26<br>27,5 |
| | 240 γ. | 0,06<br>0,08 | 14,4<br>19,2 | 26,5<br>29 |
| | 280 γ. | 0,06<br>0,08 | 16,8<br>22,4 | 28<br>29,5 |
| | 320 γ. | 0,06<br>0,08 | 19,2<br>25,6 | 29<br>30,5 |

| AUREOMICINA | |
|---|---|
| Conc./disco | Halo en mm. |
| 0,2 | 14 |
| 0,4 | 15 |
| 0,8 | 19 |
| 1,6 | 19,5 |
| 2,4 | 21 |
| 3,2 | 22 |
| 4 | 23 |
| 4,8 | 25,5 |
| 5,6 | 27 |
| 6,4 | 29 |

Con esta sencilla técnica, creemos haber dado un método fácil, rápido y cómodo para la detección de antibióticos en leche, ya que permite ensayar simultáneamente cinco concentraciones distintas de una muestra de leche problema, haciéndonos a la vez alguna idea de su concentración.

V) *Ensayos sobre la capacidad semicuantitativa del método.*

Al comprobar que se obtenían tan buenos resultados en serie, pensamos en buscar una mayor utilidad al método consiguiendo para él una técnica que fuera al menos—dada su imprecisión biológica—semicuantitativa.

Si bien es verdad que obtuvimos alentadores resultados para la aureomicina, también lo es para las otras dos sustancias, especialmente la penicilina, los datos deseados fueron mucho más difíciles de conseguir, por lo que tuvimos necesidad de hacer una serie de determinaciones con diferentes dosis de impregnación (0,02 — 0,04 — 0,06, — 0,08 y 0,1) y para doce concentraciones distintas por antibiótico (de 4 a 0,025 U/cc. de penicilina y de 500 a 20 gam./cc. de estreptomicina y aureomicina), a fin de encontrar la mínima cantidad de impregnación que era capaz de producir halos de inhibición a la concentración mínima de antibiótico, y después la concentración límite que a la máxima impregnación era capaz de producir halo.

Con estos datos como orientación, se hicieron para cada antibiótico una serie de escalas, en las que se tienen en cuenta los valores medios conseguidos entre las varias determinaciones efectuadas ( 3 ó 5, según los casos), con objeto de lograr la aplicación de estos ensayos hacia una capacidad semicuantitativa del método, lo cual se logra acudiendo a una *interpretación de resultados,* que ha de ir precedida de algunas advertencias, precisando el alcance de los datos que en ella han de intervenir:

1.º Es interesante hacer una clasificación de tipo práctico en función de la posible acción del antibiótico sobre "starters", quesos, etc., de acuerdo con sus concentraciones en leche, más que como referencia a niveles exactos de sustancia inhibidora en líquido problema, o lo que es lo mismo, establecer valores límites fáciles de diferenciar, y que a su vez sean característicos en cuanto a actividad o alteraciones sobre productos lácticos.

2.° Las respuestas de inhibición nunca son halos de diámetro fijo e invariable, sino que se encuentran ligeras variaciones, aun dentro de una misma concentración, siendo imposible establecer diferencias fijas apreciables entre concentraciones/disco tan próximas.

3.° Al objeto de disminuir errores, *tomaremos como datos a interpretar, la suma de los cinco halos formados,* en lugar de los valores individuales medios, ya que hemos tenido ocasión de comprobar que hay una correspondencia más uniforme entre las sumas de diámetros de halos y el nivel del antibiótico en la muestra láctea, que entre la conc./disco y sus halos correspondientes.

4.° Los límites que se fijan, aun siendo establecidos de un modo arbitrario por nosotros, reflejan conclusiones que para dichas concentraciones han presentado algunos autores.

Hechas estas observaciones previas, tan sólo nos queda pasar a los cuadros en los que se clasifican las posibles muestras, según propia interpretación semicuantitativa de los resultados que pudieran obtenerse. (Cuadros 5 y 6.)

CUADRO V

Penicilina.

| ACTIVIDAD | DOSIS | LECTURA DE RESULTADOS |
|---|---|---|
| No producen efecto alguno. | 0,05 U/cc. | Difícilmente detectables. |
| Perjudiciales tan solo para "starters" puros. | De 0,05 a 25 U/cc. | Se precisa montar dos siluetas con concentraciones seriadas, para detectarlas. |
| Retarda los procesos de fabricación de quesos. | De 0,25 a 0,5 U/cc. | Producèn halo a partir del tercer disco o suma inferior a 50 mm. |
| Fabricación defectuosa de cremas y quesos. | De 0,5 a 1 U/cc. | Producen halos en todos los discos, cuya suma en mm. varía desde 55 a 85. |
| Por completo inútiles para industrias lácteas. | De 1 a 2 U/cc. | La suma de los cinco halos oscila de 85 a 115 mm. |
| Pueden llegar a ser perjudiciales para enfermos, si se administran más de dos semanas. | 2 U/cc. | La suma de los cinco halos pasa de 120 mm. |

CUADRO 6

| ESTREPTOMICINA | | | AUREOMICINA | |
|---|---|---|---|---|
| LECTURA DE RESULTADOS | DOSIS | ACTIVIDADES COMUNES A AMBAS SUSTANCIAS | DOSIS | LECTURA DE RESULTADOS |
| Se precisan dos siluetas para detectarlos. | 2 γ/c. c. | Ligerísima actividad frente a alguna especie láctica aislada en cultivo. | 2 γ/c. c. | Indicios en los dos últimos discos. |
| Indicios de inhibición en los dos últimos discos. | 2 a 5 γ/c. c. | | 2 a 5 γ/c. c. | Halos en los tres últimos discos. |
| Halo en los tres últimos discos o suma inferior a 50 mm. | 10 a 50 γ/c. c. | Acción manifiesta sobre cepas lácticas puras. | | |
| Halo en todos los discos; la suma de ellos es inferior a 95 mm. | 50 a 100 γ/c c. | Concentraciones eficaces para perjudicar a los distintos tipos de "starters" lácticos. | 10 a 50 γ/c. c. | Indicios o halos de inhibición en todos los discos, pero sumando menos de 75 mm. |
| La suma de los cinco halos está comprendida entre 95 y 103 mm. | 100 a 300 γ/c. c. | Producen cremas, quesos y otros derivados lácticos, anormales o alterados | 50 a 100 γ/c. c. | Las sumas de los cinco halos oscilan de 85 a 100 mm. |
| | | | 100 a 300 γ/c. c. | Esta sumas están comprendidas entre 100 y 130 mm. |
| La suma de los cinco halos alcanza desde 105 a 125 mm. | 300 a 500 γ/c. c. | Pueden causar trastornos en la flora intestinal humana. | 300 a 500 γ/c. c. | Las sumas de los cinco halos alcanzan desde 130 hasta 160 mm. o algo más. |

Y para terminar, después de cuanto llevamos expuesto, no nos queda más que tratar del

VI) *Desarrollo de la técnica propuesta.*

*a)* Cortar, doblar y esterilizar las siluetas de papel, dentro de placas Petri, según indicamos en nuestro primer trabajo (53).

*b)* Las siluetas, bien secas y estériles, se impregnan mediante las jeringuillas indicadas, con 0,02 — 0,04 — 0,06 — 0,08 — 0,1 cc. de leche problema para cada disco; a continuación, se llevan a desecador de vacío hasta su perfecta desecación.

*c)* Verter sobre placa Petri, de 15 cm., el medio base para obtener una capa de unos dos milímetros y dejarla solidificar enfriando. Por otra parte, a unos 7 c. c. del medio de siembra fundido y enfriado hasta 45° C., se le añaden 0,5 c. c. del inóculo (suspensión de *B. subtilis* en sol. salina). Se agita por rotación y se vierte sobre el medio base para, una vez solidificado, secar durante treinta minutos en la estufa a 37° C.

*e)* Al cabo de este tiempo se colocan las siluetas, ya preparadas e impregnadas, en las placas así dispuestas. Se incuban a 37° C. durante dieciséis a dieciocho horas, al cabo de las cuales se hace la lectura de resultados y con ella la interpretación, según los cuadros que preceden a este apartado.

Este método ha sido aplicado con éxito a la detección de antibióticos en varias muestras de leche, de tres orígenes distintos: de animales normales, de animales enfermos y de muestras con concentraciones experimentales conocidas de determinados antibióticos. Sus resultados los resumimos agrupados a continuación:

*Grupo A.*—Cincuenta y tres muestras de leche del comercio, de distintas procedencias. Todas dieron resultados negativos a esta detección de sustancias antibióticas.

*Grupo B.*—Por la imposibilidad material de conseguir suficiente número de muestras de leche, procedentes de vacas afectas de mastitis y sometidas a antibioterapia, no hemos podido disponer más que de cinco muestras en estas condiciones, pertenecientes a dos animales enfermos y tratados con penicilina. En tres de ellas se detectó el antibiótico a

dosis de 3 — 1 y 0,8 U./cc., respectivamente, mientras que en las otras dos oscilaba de 0,6 a 0,25 U./cc. También tuvimos ocasión de hacer estos ensayos sobre una muestra de leche procedente de un animal que se estaba tratando por asociaciones de penicilina-estreptomicina, y obtuvimos marcados halos de inhibición, que consideramos a título de observación.

*Grupo C.*—Con las 15 muestras (cinco para cada antibiótico) preparadas a concentraciones conocidas, se obtuvieron los resultados esperados, con un error inferior al 22 %, que era siempre por debajo de la cantidad real del antibiótico en la muestra.

## CONSIDERACIONES SOBRE LOS RESULTADOS

Al examinar las técnicas en uso para la detección de antibióticos en leche, por métodos microbiológicos, hemos pensado en las ventajas de la técnica de los discos de papel impregnado sobre la de los ensayos de reducción, ya que en estos últimos es fácil predecir que nunca serán detectadas concentraciones más bajas de las eficaces para la especie microbiana que se ensaya, o bien, que cuando hay exceso de inóculo en las zonas límites, pudiera haber algo de reducción que indujese a error.

Revisando el método de los discos hemos comprobado que —sobre todo para la penicilina— es preciso trabajar con concentraciones superiores a las que con bastante frecuencia, según los datos bibliográficos, pueden encontrarse; así, concentraciones inferiores a 0,5 U./cc. de penicilina o 50 gam./cc. de estreptomicina o aureomicina, dan lugar a resultados dudosos o negativos. Estos errores pueden ser evitados empleando varios discos, que se impregnan con cantidades variables de las muestras problema y con ello surge entonces —como método aconsejable— la *técnica de las siluetas múltiples.*

De una técnica ideada y puesta en uso, en colaboración con el Profesor Socias, hemos hecho una adaptación a la investigación de antibióticos en leche.

De los resultados obtenidos en los ensayos definitivos se deduce que es una técnica que permite de un modo rápido y sencillo detectar la presencia de substancias antibióticas en la leche.

Con el uso de estas siluetas múltiples se reduce el tiempo y el tra-

bajo, así como las posibilidades de contaminación, en comparación con la técnica ordinaria de los discos. Por otra parte, la forma y disposición de las siluetas consiguen evitar las confusiones entre las distintas concentraciones que se hacen actuar.

En vista de que los halos de inhibición, dentro de ciertos límites, guardaban manifiesta relación con las concentraciones experimentales, se estableció la técnica con carácter semicuantitativo por el estudio e interpretación de los resultados, según una clasificación convencional de tipo práctico, en relación con su actividad frente a cepas, "starters" o productos lácticos.

Estudiada después la técnica sobre un total de 74 muestras experimentales y de origen natural (de vacas enfermas y sanas), se han obtenido resultados satisfactorios para la investigación de rutina, pese a tratarse de una técnica en la que influyen tantas variables. En las pruebas con muestras de concentración conocida, los niveles de antibiótico detectados son siempre 17 a 21 % más bajos de la concentración real, que, teniendo en cuenta las concentraciones tan mínimas que intervienen, carece de importancia; por otra parte, ello pudiera ser debido, tanto a error del método como a interferencias provocadas por la naturaleza biológica compleja de la muestra.

Cuando hay asociaciones de antibióticos, como en el caso relativamente frecuente de la penicilina-estreptomicina, los diámetros de los halos de inhibición son mucho mayores e imposibles de interpretar. En estos casos sería de aconsejar un tratamiento previo de una parte de la muestra con penicilina para apreciar las diferencias.

## RESUMEN

1.º Se hace una recopilación bibliográfica de los trabajos, en relación con el nuestro, fijando como resumen de la misma el estado actual del problema que nos ocupa.

2º Después de ensayar la detección de antibióticos con el clásico método de los discos, se efectuaron pruebas para la adaptación de la técnica de impregnación sobre papel de filtro en silueta múltiple.

3.º Después de efectuar casi trescientas determinaciones de antibióticos en leche, se estableció una técnica rápida de apreciación semicuantitativa para la detección de sustancias antibióticas en leche, con las ventajas que se examinan en las consideraciones que preceden.



## SUMMARY

In this work, there is a short summary of an application of the antibiogram technique on impregated paper in multiple silhouette for semiquantitative determination of penicillin, streptomycin and aureomycin in milk.

The results obtained from 74 samples are compared with those received with the common disc method.


## BIBLIOGRAFIA


(1) Alford, Heljo y Mc Crory. J. Am. Vet. Med. Ass. 126, 294 (1955).
(2) Angelotti, Weiser, Slatier y Gould. Appl. Microbiol. 3, 234 (1955).
(3) Arnold y Lett. Laryngoscope 61, 649 (1951).
(3 b) Auclair y Portmann. Nuov. Ann. Ig. Microbiol. 5, 241 1954).
(4) Balows y Barker. Antibiot. & Chemot. 5, 551 (1955).
(4 b) Bergamini. Ann. Tech. Agric. 4, 121 (1955).
(5) Berridge, J. Dairy Res. 23, 342 (1956).
(6) Berridge. Idem, idem 23, 348 (1956).
(7) Berridge, Idem, idem 23, 336 (1956).
(8) Blackburn, J. Dairy Res. 23, 225 (1956).
(9) Bondi, Spaulding, Smith y Dietz. Am. Mod. Sci. 213, 221 (1957).
(10) Broom, Martineau y Young. Bact. Proc. Boston 120 (1952).
(11) Bryan. J. Milk and Food Tech. 14, 161 (1951).

(12) Calbert. J. Milk and Food Tech. 14, 61 (1951).
(13) Claybaugh y Welson. J. Milk and Food Tech. 14, 155 (1951).
(14) Cooper. Nature 176, 510 (1955).
(15) Christensen y Lipsett. News Letter S.A.B. 17, 15 (1951).
(16) Churchil, Drury, Lewis, Frank y Bryan. Milk Plant Monthly 40, 28 (1951).
(17) Diernhofer. Monetshefte fur Veterinar-medizin 1-VI-1956.
(18) Dopter. Lait 37, 20 (1957).
(19) Dudani y Ahuja. Indian J. Med. Res. 43, 555 1955).
(20) Ericson, Hogman y Wikman. J. clin. Lab. Invest. 6, 23 (1954).
(21) Florestano y Bahler. Veter. Med. 10, 441 (1955).
(21 b) Fusillo y Kuhns. Med. Tec. Bull. 3, 7 (1952).
(22) Galeslot. Biol. Abs. 31, 2030 (1957).
(23) Galeslot y Petre. Biol. Abs. 31, 8629 (1957).
(24) Gogas y Bicknell. Milk Plant Monthly 42, 26 (1953).
(25) Goldin y Sohn. Modern. Hospital 82, 92 (1954).
(26) Gould y Bowie, Edinburg Med. J. 59, 178 (1952).
(27) Grecue y Bell. Sci. Abric. 32, 619 (1952).
(28) Harmon. Texas Jour. Sci. 3, 167 (1951).
(29) Jacquet y Steeg. C.R. Acad. Agr. Fran. 2, 609 (-952).
(30) Johns. Can. J. Agric. Sci. 33, 586 (1953).
(31) Johns y Bersins. J. Milk and Food Tech. 19, 14 (1956).
(32) Kolmer, Spaulding y Robinson. Approved Laboratory Technique (1951).
(33) Krienke. Milk Plant Monthly 40, 52 (1951).
(34) Laszlo y Szabo. Bull. Inst. Pasteur 54, 56 (1956).
(35) Lemoigne, Sanchez y Girard. C.R. Acad. Agr. Frn. 39, 608 (1952).
(36) Lignal y Claude. Chim. et Indust. 72, 51 (1954).
(37) Lind y Swanton. J. Antibiot. and Chemoth. 2, 30 (1952).
(38) Morley. J. Path. Bact. 57, 379 (1945).
(39) Mossel. Nature oLnd. 166, 188 (1950).
(40) Neal y Calfert. J. Dairy Sci. 38, 629 (1955).
(41) Nutting y Barber. J. Milk and Food Tech. 19, 162 (1956).
(42) Obiger. Pharmazie 11, 406 (1956).
(43) O'Tooley. Am. J. Med. Tech. 12, 251 (1946).
(44) Pedersen y Moller-Madsen. Dairy Sci. Abst. 19 461 (1952).
(45) Pien. Lignal y Claude. Ann. Falsif. 46, 258 (1953).
(46) Pike, Schulze y Mc Cullough. Am. J. Cli. Path. 21, 1094 (1951).
(47) Ray. Chim. et Indus. 64, 166 (1950).
(48) Richou y Thieulin. Recueil de Medicine Veterinaire de l'Ecole d'Alford 2, 73 (1955).
(49) Rohrlich y Essner. Disch. Lebensmitt 50, 94 1954).
(50) Scherr. Antibiot. & Chemot. 4, 1007 (1954).
(51) Schipper. Vet. Med. 50, 111 (1955).
(52) Silverman y Korikowsky. J. Milk and Food Tech. 15, 120 (1952).
(53) Socias y Portoles. Microbil. Española 9, 353 (1956).

(54) Stolz y Hankinson. Appl. Microbiol. 1, 24 (1953).
(55) Stolz y Hankinson. J. Milk and Food Tech. 16, 157 (1953).
(56) Stolz y Hankinson. J. Milk and Food Tech. 17, 76 (1954).
(57) Sweeney, Davis y Barnes. Navy Med. Res. Inst. Res. Report. Project. N M 005 948, 04.13.
(58) Thome. Svenska Mejeritidningen 45, 13 (1953); Biol. Abst. 27, 2161 (1953).
(59) Tollenaar y Mossel. The Hafne 3, 1381 (1953).
(60) Treccani. Ann. Microbiol. 5, 93 (1953).
(61) Ullberg Nord. Veterinaermed. 4, 1061 (1952).
(62) Welch, Jester y Burton. Antibiot. & Chemoth. 5, 571 (1955).
(63) Welch, Jester y Burton. Antibiot. & Chemoth. 6, 369 (1956).
(64) Whitehead y Lane. J. Dairy Res. 23, 355 (1956).
(65) Wilkowske y Krienke. J. Milk and Food Tech. 18, 264 (1955).
(66) Wilkowske y Krienke. J. Dairy Sci. 37, 1184 (1954).

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

# LA REACCION P/H Y SU VALOR PARA EL DIAGNOSTICO DE LAS FASES DEL VIRUS GRIPAL

POR

L. ALBALADEJO Y G.ª BERENGUER

Al describir el cultivo del virus de la gripe española en nuestros estudios sobre la epidemia del otoño de 1957, que hemos publicado en la "Revista de Biología" (1), decíamos las facilidades que para efectuar el aislamiento del referido virus nos dió la aplicación de esta reacción que hemos creado, fundamentada en un principio lógico, derivado de los estudios de Burnet (2) sobre la ecología (*) del agente causal de la gripe.

Son muchos los compañeros que nos han pedido una explicación amplia y una pauta del modo de llevar a cabo la reacción, que consiste simplemente en obtener el título de aglutinación del virus de la gripe a los glóbulos rojos de pollo y dividirlo por el título de aglutinación a los glóbulos rojos de procedencia humana (grupo universal).

Es sabido que la comprobación del virus de la gripe, cultivado en el embrión de pollo, ofrecía bastantes dificultades antes del descubrimiento de Hirst: había que examinar las células del contenido traqueal del embrión en cada huevo inoculado.

Hirst (3) observó de una manera empírica —y luego ha comprobado que tenía un valor cuantitativo y servía incluso para hacer titulaciones—, que los eritrocitos de pollo de menos de un año eran aglutina-

(*) Conviene aclarar el concepto de la palabra *ecología*, muy usada al hablar de los virus. Del griego *oikos* = casa, y *logos* = tratado; significa literalmente "tratado de la casa de alguien". y se refiere al estudio del modo de vivir y sus relaciones con los seres que le rodean. En nuestro caso concreto, los caracteres del virus de la gripe y las reacciones que efectúan ante él los enfermos portadores, animales inoculados o el embrión de pollo empleado para su cultivo, es el concepto que debe de comprenderse con el nombre de ecología.

dos por el virus de la gripe a la temperatura del Laboratorio, pudiéndose leer el resultado a la hora y media de efectuar la mezcla en unos tubos corrientes de los empleados para la reacción de Kahn.

Varios autores, después, han investigado y publicado la aglutinación de hematíes de distintas procedencias con el virus de la gripe y con otros virus más o menos próximos, sacando consecuencias de valor diagnóstico. Smadel (4) hace un resumen muy demostrativo en el cuadro que traducimos a continuación.

CUADRO 1.

Aglutinación de eritrocitos de distinta procedencia por diferentes virus. (Smadel (*).

| Origen de los eritrocitos | GRIPE | | | Parotiditis | Vacuna | Viruela | Peste aviar | New-castle | Pneumonia ratón | Eritromelia |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | A | B | Porc. | | | | | | | |
| Hombre.. | + | + | — | + | ± | ? | — | — | — | — |
| Pollo... | + | + | — | + | — | — | — | — | — | — |
| Gato..... | — | — | — | ? | — | ? | — | — | — | ? |
| Perro..... | + | ? | ? | ? | ? | ? | — | — | — | ? |
| Vaca..... | — | + | — | ? | — | ? | — | — | ? | — |
| Burro ... | — | + | ± | ? | — | ? | ? | — | — | ? |
| Caballo... | — | ± | — | ? | — | ? | — | — | ? | ? |
| Cabra.... | ± | + | — | ? | — | ? | ? | — | ? | ? |
| Cordero.. | ± | ± | — | ? | — | ? | — | ± | — | — |
| Hurón.... | + | + | + | ? | + | ? | ? | — | — | ? |
| Mono.... | — | ? | ? | ? | — | ? | — | — | ? | ? |
| Cobaya... | + | + | — | ? | + | ? | + | + | — | — |
| Ratón.... (Blanco.) | ± | ± | — | ? | + | ? | ? | + | + | + |
| Conejo... | ± | ± | + | ? | ± | ? | ? | ± | — | — |
| Rata.. . | ± | ± | — | ? | ± | ? | ? | + | — | — |
| Rana..... | + | + | + | ? | — | ? | ? | + | ? | ? |

(*) El signo (?) indica que no se tienen datos. El signo (±), que unos autores dan resultado positivo y otros negativo.

Burnet (5), efectuando estudios comparativos sobre la aglutinación del virus de la gripe con los eritrocitos de pollo y con los eritrocitos de cobaya, saca interesantes conclusiones que le permiten afirmar que el

virus en la fase O, que es el que se encuentra en el enfermo, aglutina mejor a los hematíes de cobaya, y el virus en la fase D, que es el adaptado, da una aglutinación más intensa a los hematíes de pollo. Diferencia, pues, Burnet dos fases en el virus gripal, sea cual sea la cepa, variante o tipo a que pertenezca: la fase *original*, que llama O, que es la que produce la enfermedad en el hombre, y la fase *derivada* D, adaptada al hurón, al ratón o al embrión de pollo.

Aunque en el estudio publicado por la O. M. S. (6) no se hace referencia a las dos fases descritas por Burnet, sí se advierte que el virus aislado en Singapur (Asia/57) se cultiva difícilmente, y que los primeros pases en el huevo suelen ser inaparentes, lo que demuestra que la hemoaglutinación a los eritrocitos de pollo es negativa todavía.

Este dato nos hizo pensar en la posibilidad de poner de relieve el virus en estos pases, que debían corresponder a la fase O de Burnet, por medio de la aglutinación de eritrocitos de otra procedencia. Y lógicamente nos habíamos de inclinar (aunque también ensayamos los de varios animales) por los de un donador universal humano, ya que el virus, al obtenerse de un enfermo, había de conservar su propiedad aglutinante, mucho mayor para estos hematíes.

El resultado fué como esperábamos; los líquidos amniótico o alantoideo infectados, antes —a veces varios pases, que incluso pueden llegar a diez— de dar la aglutinación positiva a los eritrocitos de pollo la dan a los eritrocitos humanos.

Hemos efectuado múltiples comprobaciones y repetido numerosos experimentos con el virus adaptado al ratón, adaptado al embrión de pollo y en procesos intermedios.

La afirmación de Burnet (7) de que el virus gripal en fase O da una aglutinación más intensa a los eritrocitos de cobaya que el virus gripal en fase D, adaptado a los animales, y que éste, en cambio, da una aglutinación mayor a los glóbulos rojos de pollo, podemos modificarla en el sentido siguiente, que ha servido de fundamento a nuestra reacción:

*El virus gripal en fase O (original) procedente del enfermo, aglutina más intensamente los hematíes humanos que el virus gripal en fase D (derivada) adaptado al embrión de pollo, y el virus D, adaptado al embrión de pollo, aglutina más a los hematíes procedentes de este animal.*

No podemos afirmar que este hecho se repita, cuando la fase D está conseguida por adaptación del virus al ratón y probablemente ocurrirá lo mismo con la fase D del hurón. Nuestros trabajos sólo han tratado de estudiar la adaptación del virus gripal al embrión de pollo, pero creemos que cambiando los glóbulos de pollo por los del ratón o hurón, respectivamente, se podrá emplear esta reacción para comprobar la fase derivada (D) del virus a estos animales.

El valor de este fenómeno es innegable, puesto que permite continuar los pases de siembra de un virus en la fase O, aunque no dé la reacción de Hirst positiva, hasta conseguir su adaptación al embrión de pollo, y evita considerar como negativo un aislamiento, que sólo necesita algún pase más de los efectuados para poder comprobar el virus con la reacción corriente.

* * *

La discrepancia en el título de aglutinación del virus de la gripe a los eritrocitos humanos y a los eritrocitos de pollo, tiene un ritmo constante en relación siempre con el proceso de adaptación o mutabilidad del virus.

Este ritmo se puede analizar con cualquiera de los procedimientos de la Biometría, propuestos por Bonnier (8) o Halvorson (9), aunque resultan bastante complicados.

Hemos visto que el virus gripal procedente de un enfermo, fase O, sin adaptar aún al huevo, produce una fuerte aglutinación a los hematíes humanos y nula o muy pequeña a los de pollo.

El virus gripal adaptado al embrión de pollo, fase D, aunque no pierde su poder aglutinante a los hematíes humanos, lo adquiere, cada vez más intenso, para los hematíes de pollo. Este poder puede llegar a tener un título de aglutinación mayor que la primera.

La fórmula matemática más sencilla para expresar con un solo número la relación entre las dos aglutinaciones es un cociente. La división del título de aglutinación más bajo por el más alto nos dará una cifra que variará exactamente en la proporción en que se efectúa la adaptación del virus. Y este cociente, expresado en forma de quebrado con las iniciales que indican la procedencia de los eritrocitos que hemos utilizado para las aglutinaciones y que representan la máxima dilución del virus con la cual es positiva la hemoaglutinación, es lo que constituye la *reacción P/H*, que se puede definir diciendo: *Es el cociente de dividir*

*el título de aglutinación de un virus gripal con glóbulos rojos de pollo de menos de un año, por el título de aglutinación del mismo virus con glóbulos rojos humanos de grupo universal.*

Cuando el resultado o *razón* se aproxima más a cero, indicará que existe una mayor diferencia entre los títulos de las dos aglutinaciones y que el virus está más adaptado al hombre y menos al huevo; se encontrará en la fase original O.

Cuando la cifra se aproxima más a la unidad, más habrá derivado el virus, fase D, y más se habrá adaptado al embrión de pollo. Si por numerosos pases, ha disminuído su adaptación al hombre, acabará por sobrepasar a la unidad.

Nosotros, para dar una interpretación matemática al resultado, consideramos de 0 a 0.33 como virus en fase original; de 0.67 a 1, como virus en fase derivada, y de 0.34 a 0.66 como estado de transición.

La técnica de la reacción es muy sencilla, y para efectuarla necesitamos:

1.° El antígeno a investigar.
2.° Glóbulos rojos de pollo de menos de un año.
3.° Glóbulos rojos humanos de grupo universal.
4.° Solución salina al 8 %.
5.° Una gradilla y tubos de Kahn.

Como controles podemos poner un antígeno positivo y otro negativo, ya conocidos.

Otro control que usamos siempre, es un tubo sin antígeno, con la solución salina y los glóbulos rojos únicamente.

Por último, cuando hemos tenido suero específico (antisuero de conejo o suero de convaleciente) hemos completado la reacción efectuando la inhibición de la aglutinación por la adición previa al antígeno del suero en cantidades decrecientes.

*Antígeno.*—Podemos emplear el líquido amniótico o alantoideo en dilución base $10^{-1}$ con Tyrode (*), como recomienda Hirst para su he-

(*) La fórmula del Tyrode (recomendada por Parker y por Sander como la mejor), se compone: ClNa, 8 gr.; ClK, 0,20.; $Cl_2Ca$, 0,20 gr.; $Cl_2Mg$ 6 $H_2O$, 0,10 gr.; $PO_4HNa$ $H_2O$, 0,05 gr.; $CO_3HNa$, 1,00 gr.; glucosa, 1,00 gr.; agua tridestilada, hasta completar 1.000 c. c.—Fíltrese.

moaglutinación. Cada centrímetro cúbico de material extraído del huevo se mezcla con 9 c. c. de la solución, se centrifuga a 4.000 r. p. m. y se tira el contenido de los tubos que presentan un sedimento de hematíes, conservando congelados a — 20° C. sólo los que no contengan sangre. Nosotros preferimos prepararlo al 1/40 (1 c. c. de la dilución 10 — 1 por 3 c. c. de Tyrode) con el objeto de obtener el límite de la aglutinación con pocos tubos. Para conservarle empleamos Zefirol al 1/1.000, que no altera sus propiedades antigénicas.

*Glóbulos rojos de pollo.*—Se obtienen sangrando pollos de menos de un año de la vena humeral. Se sacan 5, 10 ó 20 c. c. con una jeringuilla de vidrio vaselinado que contenga 4 c. c. de la dilución de citrato sódico en agua destilada al 5 % (*). Los glóbulos son lavados tres veces por centrifugación a 4.000 r. p. m. Después se centrifugan a 1.800 r. p. m. diez minutos y el sedimento de hematíes se completa con solución salina hasta hacer una suspensión al 1 % en volumen, que debe ser empleada recién hecha.

*Glóbulos rojos humanos.*—Sólo pueden utilizarse glóbulos de donadores del grupo O (universales), para evitar hemoaglutininas naturales en el curso de la reacción. Se lavan lo mismo que los de pollo. La suspensión se hace también en solución salina al 1 %.

*Solución salina.*—Empleamos cloruro de sodio purísimo al 8 %, en agua destilada, sin trazas de cobre. Para ello utilizamos alambique de cristal, y en la tercera destilación, pirex.

*Gradilla y tubos de Kahn.*—De tipo corriente, con fondo plano para percibir mejor la sedimentación de hematíes. El número de tubos para cada reacción es 18, en dos filas.

*Manera de efectuar la reacción.*—Se colocan en los tubos, por el mismo orden y en las cantidades indicadas, los componentes de la reacción, según la pauta siguiente: El antígeno, desde el 2.° al 8.° tubo, se

(*) La solución de Alsever puede emplearse con ventaja. Se compone de: Glucosa (dextrosa), 2,05 gr.; ClNa, 0,42 gr.; citrato trisódico, 0,8 gr.; ácido cítrico, 0,55 gr.; agua destilada, hasta completar 100 c. c.; se emplea poniéndolo a partes iguales con la sangre. En general se ponen 20 c. c. en frasquitos de 50 c. c. Se elimina el aire parcialmente por succión. Se esterilizan al autoclave y se conservan así hasta dos semanas.

diluye y se saca la misma cantidad que se ha puesto; la del 8.° se tira, para que el 9.° no lleve antígeno. El título de las diluciones varía desde el 1/40 al 1/5.120. La cantidad total en cada tubo es de 0.75 c. c.

CUADRO 2.

Pauta para la reacción P/H con diluciones de antígeno en progresión aritmética.

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sol. Salin..... | 0,0 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Antig. 1/40..... | 0,5 | 0,5— | 0,5— | 0,5— | 0,5— | 0,5— | 0,5— | 0,5— | 0,0 |
| Glob. 1/100... . | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Título..... | 1/40 | 1/80 | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | 1/2560 | 1/5120 | Testigo |

Agitar fuertemente la gradilla unos minutos.

Reposo a la temperatura de la habitación.

Lectura sin mover los tubos a los cuarenta y cinco minutos y a la hora y media o dos horas.

Se considera como título el del último tubo que da una aglutinación total o parcial.

Esta pauta debe de repetirse igual, poniendo en una fila los tubos con los glóbulos rojos de pollo y en la otra con los glóbulos rojos humanos.

A los cuarenta y cinco minutos es importante efectuar una lectura, dedicando una atención especial a los primeros tubos, que, en caso positivo, presentarán un sedimento de tipo granular en la parte baja, pues cuando existen proteínas muy concentradas, la velocidad de aglutinación se acelera y ésta se hace más granular.

A la hora y media o, mejor a las dos horas, se efectúa la verdadera lectura, teniendo presentes y anotados los tubos de aglutinación acelerada.

Si la progresión aritmética que ponemos en la pauta anterior para diluir el antígeno no fuera suficiente, por el alto poder aglutinante del mismo, podemos emplear una pauta con diluciones logarítmicas (progresión geométrica), como la siguiente:

CUADRO 3.

Pauta para la reacción P/H con diluciones de antígeno en progresión geométrica.

| Tubos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Sol. Salin..... | 0,0 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 0,9 | 1,0 |
| Antig. 1/10..... | 1,0 | 0,1— | 0,1— | 0,1— | 0,1— | 0,1— | 0,1— | 0,1— | 0,0 |
| Glob. 1/100..... | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Título..... | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ | Testigo |

Para el examen de la aglutinación es preferible emplear la luz artificial, y Rivers (10) recomienda un espejito a 45° para que la refleje.

Cuando es *positiva,* y no hay un exceso de proteínas, los hematíes de pollo y los hematíes humanos caen lentamente, tendiendo a adherirse a las paredes del tubo y pasando suavemente al fondo. Si *no se mueve* la gradilla, forman una masa de contorno difuso en el fondo, que permanecerá igual durante varias horas.

Estos tubos se diferencian bien de aquellos en que la aglutinación es *negativa,* en la cual caen los glóbulos rojos sólo al final y forman un compacto botón en el centro del fondo del tubo, con un borde neto y definido.

Anotada la dilución del tubo que corresponde a la aglutinación parcial última observada en cada fila, tenemos el título de P (glóbulos de pollo) y de H (glóbulos humanos), que dividiremos para obtener la *razón* o cociente. La operación se simplifica reduciendo el numerador a la unidad y el denominador a la cifra correspondiente.

En las ocho cepas (*) aisladas por nosotros de los enfermos de gripe en Madrid y provincias durante el otoño de 1957, hemos empleado la reacción P/H sistemáticamente en cinco de ellas. Los resultados al 1.°, 5.°, 10.° y 20.° pase los podemos ver en los cuadros siguientes:

(*) Como explicamos en nuestros estudios sobre "La epidemia de gripe en España", la palabra *cepa* (del latín *scippus* = tronco o raíz) la empleamos para distinguir cada uno de los aislamientos efectuados, sin prejuzgar sus caracteres. Véase la "Revista de Biología de Analistas Españoles", VII, enero-febrero, 1958.— La epidemia de gripe en España.—Cultivo del virus.

CUADRO 4.

Resultados de la aglutinación a eritrocitos de pollo y humanos en algunos de los aislamientos del virus E/1957.

| Nombre cepa | Reacción Hirst positiva | 1.er PASE (48 hrs.) | | 5.° PASE | | 10.° PASE | | 20.° PASE | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | P | H | P | H | P | H | P | H |
| $E_2$ | 6.° pase.. | — | 1/40 | — | 1/160 | 1/320 | 1/640 | 1/640 | 1/640 |
| $E_4$ | 1.er pase.. | 1/160 | 1/640 | 1/320 | 1/640 | 1/320 | 1/640 | 1/320 | 1/640 |
| $E_6$ | 3.er pase. | — | 1/80 | 1/320 | 1/640 | 1/640 | 1/640 | 1/640 | 1/640 |
| $E_7$ | 2.° pase.. | — | 1/160 | 1/320 | 1 640 | 1/640 | 1/640 | 1/640 | 1/640 |
| $E_8$ | 2.° pase.. | — | 1/320 | 1/640 | 1/1280 | 1/640 | 1/1280 | 1/1280 | 1/1280 |

CUADRO 5

Reacción P/H y razón en los aislamientos efectuados del virus E/1957.

| Nombre cepa | 1.er PASE | | 5.° PASE | | 10.° PASE | | 20.° PASE | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | P/H | Razón | P/H | Razón | P/H | Razón | P/H | Razón |
| $E_2$ | 1/2 | 0,5 | 1/3 | 0,3 | 1/2 | 0,5 | 1/1 | 1,0 |
| $E_4$ | 1/3 | 0,33 | 1/2 | 0,5 | 1/2 | 0,5 | 1/2 | 0,5 |
| $E_6$ | 1/3 | 0,33 | 1/2 | 0,5 | 1/1 | 1,0 | 1/1 | 1,0 |
| $E_7$ | 1/4 | 0,25 | 1/2 | 0,5 | 1/1 | 1,0 | 1/1 | 1,0 |
| $E_8$ | 1/5 | 0,20 | 1/2 | 0,5 | 1/2 | 0,5 | 1/1 | 1,0 |

En los cuadros y en la gráfica se comprueba que el virus va mutando en los pases sucesivos su poder de aglutinación.

De no haber aparecido la reacción de Hirst en la primera siembra puede hacerse positiva después. En todo caso, el poder de aglutinación a los eritrocitos de pollo aumenta con las siembras en el embrión.

La aglutinación a los eritrocitos de procedencia humana se da antes que la reacción de Hirst. En algún caso aumenta su título con los pases en embrión, pero corrientemente se sostiene su poder aglutinante igual.

En el aislamiento del enfermo número 2 la reacción de hemoaglutinación de Hirst ha sido negativa hasta el 6.° pase, en que se hizo positiva, pero la reacción con los hematíes humanos era ya positiva a las cuarenta y ocho horas, o sea en el primer pase; aunque poco intensa, demostrativa de que el crecimiento del virus era aun pequeño, nos hizo persistir en las siembras, obteniendo al final el resultado expuesto. Ob-

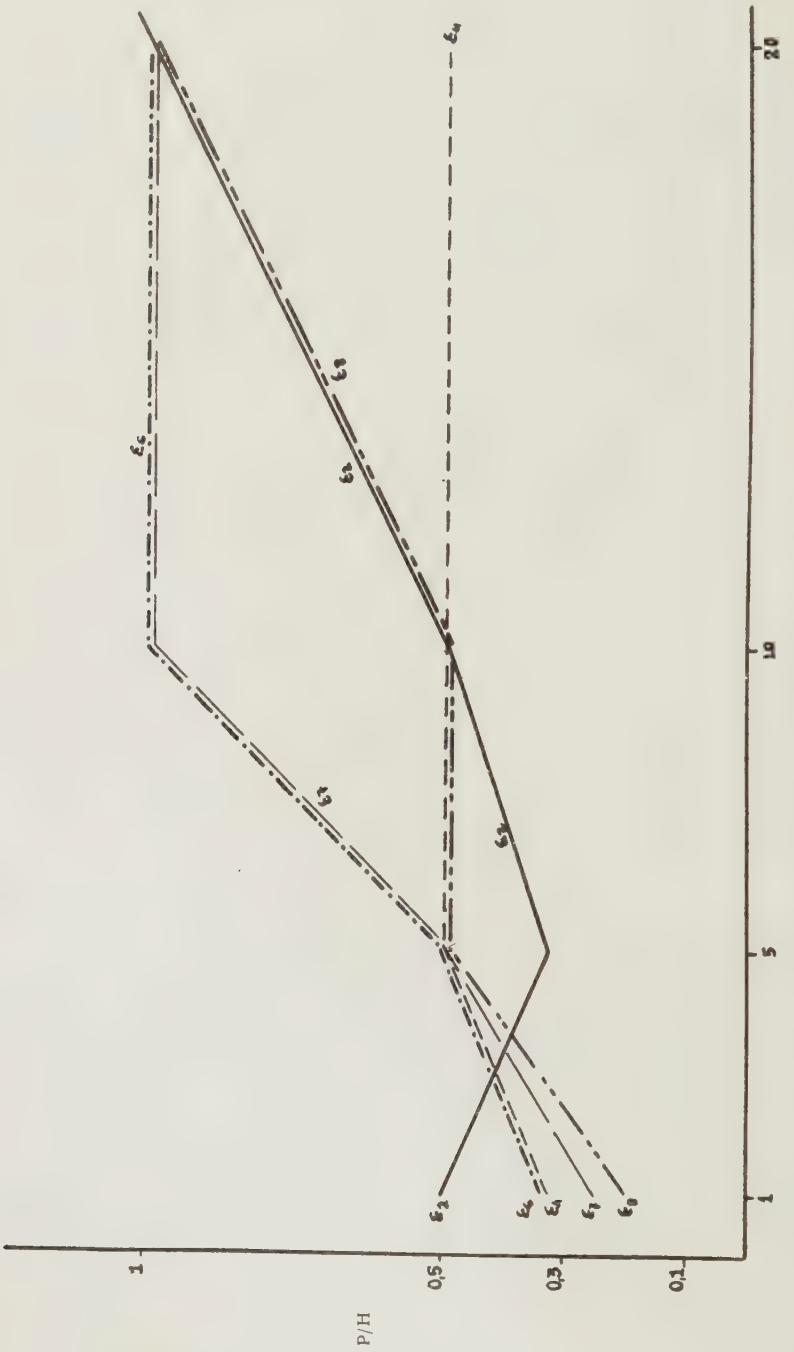


FIG. 1.

servemos cómo la *razón* se acerca a la unidad hacia el 10.° pase y sobre todo al 20.°

Los aislamientos $E_4$, $E_6$, $E_7$ y $E_8$, han dado la reacción de Hirst positiva del 1.° al 3.° pase. El $E_2$ al 6.° La aglutinación a los eritrocitos humanos la han dado desde la primera siembra.

En general, vemos que la reacción P/H va aumentando su valor desde los primeros a los últimos pases en embrión de pollo.

En la gráfica se observa claramente el resultado de la reacción en las cinco cepas estudiadas. Solamente ha quedado por bajo de la unidad la cepa $E_4$, que precisamente dió positiva la reacción de Hirst en el primer pase. Si consideramos la *unidad*, en el cociente P/H, como expresión de la mutación completa del virus en su adaptación al huevo, tendremos que afirmar que se verifica corrientemente al 10.° pase, pero que deberemos continuar hasta el 20.°, y a veces más, para tener la seguridad de la misma.

## CONCLUSIONES

1.ª Por comparación de la aglutinación de un virus gripal a los hematíes de pollo y a los hematíes humanos, podemos sacar la consecuencia de si este virus se encuentra en la fase *original* (O) o en la fase *derivada* (D), con adaptación al embrión de pollo.

2.ª El mejor procedimiento para hacerlo es obtener el cociente o razón P/H dividiendo el título de aglutinación a los glóbulos de pollo por el título de aglutinación a los glóbulos humanos, procedentes de un donador universal.

3.ª El poder comprobar que el virus está cultivado, por su aglutinación a lo sglóbulos humanos, aunque no dé aglutinación positiva a los hematíes de pollo, tiene la ventaja de poder continuar los pases en el embrión, hasta que esté adaptado, en lugar de desechar la siembra como negativa.

4.ª El empleo sistemático de la reacción, en el material de pases posteriores en el huevo, pondrá de relieve las distintas fases y la forma en que progresa la adaptación del virus a la fase D.

5.ª Creemos, además, de acuerdo con los trabajos de Smith (*), que la reacción P/H es de una gran aplicación en el estudio de la gripe y que podrá aclarar con su empleo varios puntos aún sin dilucidar, sobre la ecologia del virus causal de esta enfermedad.

## RESUMEN

Para el estudio de los virus gripales, el autor crea una reacción que denomina P/H.

Tiene como antecedentes, la reacción de Hirst (hemoglutinación de los eritrocitos de pollo con el virus gripal) y los trabajos de Burnet (hemoaglutinación de los eritrocitos de pollo y de los eritrocitos de cobaya con el virus gripal).

La reacción, muy sencilla, consiste en dividir el título de aglutinación de un antígeno gripal con eritrocitos de pollo, por el título de aglutinación del mismo antígeno con eritrocitos humanos (sangre de tipo universal).

Con ella se pueden diferenciar las fases del virus gripal descritas por Burnet. Cuando el cociente se aproxima a la unidad, el virus está adaptado al embrión de pollo (fase derivada, D) y cuando no llega a 0,33, se encuentra en fase original (O) de adaptación al enfermo, y esta adaptación es tanto mayor cuanto más se aproxima la razón a cero.

La reacción tiene grandes aplicaciones para el estudio del virus gripal, entre otras muchas, la de poner de relieve las formas inaparentes de este virus, antes de que sea positiva la hemoaglutinación a los glóbulos rojos de pollo.

(*) Smith, en su libro "The virus life's Enemy", Cambrige, 1948, y en "An Introduction to the Study of Viruses", London, 1950, hace una exposición de diferentes cuestiones todavía sin resolver, referentes a diferentes virus, entre los que sitúa como de la mayor importancia al de la gripe.

## RESUME

Pour l'études du virus grippal, l'auteur a crée una réaction qu'il appelle P/H.

La reaction présente comme précédents celle de Hirst et les travaux de Burnet.

Cette réaction P/H est très simple, elle consiste en divisant l'agglutination avec erytrocytes de poulet, par l'agglutination avec erytrocytes humains.

Par elle on peut differencier la phase du virus grippal. Lorsque le quotient s'approche a l'unité, le virus est adapté a l'embryon de poulet (phase D) et lorsqu'il n'attend pas 0,33, il se trouve dans la phase originale (phase O) du malade.

La reaction trouve une application a fin de faire ressortir les formes cachées du virus, avant que la hémoagglutination des érytrocytes de poulet ne soient positive.

## SUMMARY

For the study of the influenza virus the author has created a reaction which he calls P/H.

The reaction offers as precedent the reaction of Hirst and the studys of Burnet.

This /PH reaction is very simple. It consists of the ratio between the agglutination with chicken erythrocytes and agglutination of human erythrocytes.

This way one can differentiate the influenza virus stage. When the ratio is approaching the unit, the virus is adapted to the chicken embryo (phase D) and when it does not reach 0.33, it is in the original phase (O) of the patient.

The reaction can be used to spot the non apparent forms of the virus.

## ZUSAMMENFASSUNG

Zum Studium des influenza Virus, der Bearbeiter hat eine Reaktion geschaffen welche er P/H nemit.

Die Reaktion hat als Vorgänger die Hirst-Reaktion und die Studien von Burnet.

Diese P/H - Reaktion ist sehr einfach.—Sie besteht aus der Division der Huhnerythrozytenagglutination durch Menschlicheerythrozytenagglutination.

Durch dieselbe Kann man die Phase des Influenza-Virus emterscheiden.—Wenn der Quozient sich der Einheitnähert, der Virus ist dem Huhm-Embryo (Phase D) adaptier, emd sobald er nicht 0,33 erreicht, befindet er sich in der original-Phase (O) des Kranken.

Die Reaktion findet eine Anwendung um die nicht erscheinenden Formen des Virus bemerkbar zu machen.

## BIBLIOGRAFIA

(1) Albaladejo G.ª-Berenguer. La epidemia de la gripe en España. Aislamiento del agente causal de la misma. Nota previa. (1957) Rev. de Diagnóstico Biológico. VI, 404.

Albaladejo G.ª-Berenguer. 1958. La epidemia de gripe en España. Otoño de 1957. Estudio sobre el agente causal. I. Cultivo del virus. Rev. Diag. Biol. VII, 1-21. (enero-febrero).

Albaladejo G.ª Berenguer. 1958. La epidemia de gripe en España. Otoño 1957. Estudio sobre el agente causal. II Morfología del virus. Rev. Diag. Biol. VII (marzo-abril), en prensa.

Albaladejo G.ª Berenguer. 1958. La epidemia de gripe en España. Otoño 1957. Estudio sobre el agente causal. III Comprobaciones serológicas. IV Adaptación del virus al ratón. Rev. Diag. Biol. VII (en preparación).

Albaladejo G.ª Berenguer. 1958. El virus de la gripe española. Medicamenta n.º 319, 11, 1958.

Albaladejo G.ª Berenguer. 958. Concepto actual de los virus. Gaceta Médica Española XXXII, 63.

(2) Burnet. 1950. Virus as organism. Monografía núm. 8. Universidad de Harward.

(3) Hirst. 1942. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. J. Exp. Med. 75, 49-64.

(4) Smadel. 1952. Agglutination of Erythrocites by Viral and Rickettsial Agents. En el libro de Rivers "Viral and Rickettsial infection of man" 2.ª edición.
(5) Burnet. 1936. Influenza virus on the developing egg. J. Exp. Path, 17, 282.
(6) Comision of influenza. J. A. M. A. 1944. 124-982.
(7) Burnet and Clark. 1942. Influenza. Monografía Walter & Eliza Hall Institut n.º 4. Melbourne.
Burnet and Bull. 1944. Re-examination of the influenza virus strain "Melbourne egg." Austral. J. Exp. Biol. 22,173.
(8) Bonnier and Tedin. Biologisk wariationsanalys. Stockolm 1940.
(9) Halvorson and Ziegler. 1932. Aplication of Statistics to problems in bacteriology. J. Eact. 25, 101.
(10) Rivers. 1952. Viral and Rickettsial infections of Man. Tomas Milton.
(11) Smith. 1948. The Virus life's Enemy. Cambridge.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

# TITULACION DEL VIRUS DE LA POLIOMIELITIS S. K. NEW HAVEN

POR

L. ALBALADEJO Y G.ª BERENGUER

La cepa S. K. New Haven del virus de la poliomielitis es posiblemente una de las más conocidas, después de los trabajos de Jungeblut (1), que consiguió adaptarla al ratón.

En España ha servido para unos trabajos especiales de Sanz Ibáñez (2), que la ha conservado, cediéndola posteriormente a Gallardo (3), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Por cortesía de D. Eduardo Gallardo, a quien quedamos eternamente reconocidos, hemos podido disponer de este virus para una serie de estudios que tenemos planeados sobre poliomielitis (*).

De acuerdo con las ideas de Gard (4) era necesario, como primer paso, efectuar la valoración actual del mismo, el único que, probablemente, existe en nuestra Patria, de la enfermedad que constituye el problema sanitario de mayor actualidad.

La exactitud con que la actividad de un virus es medida, sirve de

---

(*) Actualmente intentamos conseguir, y hemos tenido éxito hasta ahora, la mutabilidad irreversible del virus de la Poliomielitis S. K. New Haven cuyo fenómeno puede servir de base para la inmunización activa contra la enfermedad. Payne considera el empleo de virus vivos, en su último trabajo de la Organización Mundial de la Salud (B. O. M. S. 1957, n.º 5, 16, 891-1082.—Studies on Vaccination against Poliomyelitis with Live Virus Vaccines), como el procedimiento de elección en el porvenir.

Esperamos del "Nederlands Instituut voor Praeventieve Geneeskunde, Wassenaan arseweg, Leyde" (Holanda) el envío de las cepas ofrecidas (Brunhilda, Lansing y Leon) para comprobar y publicar nuestros experimentos, que es posible, permitirán una vacunación polivalente, con virus vivos mutados, sin peligro alguno, a la manera de la vacunación contra la viruela.

base a todas las cuestiones relacionadas con los problemas que plantea.

Para conocer el número de bacterias contenidas en un producto, podemos utilizar dos métodos: el recuento en una placa, o el efectuar diluciones. La interpretación de los resultados deberá hacerse por análisis estadístico.

En un virus podemos también distinguir: el número de partículas, o la virulencia de la cepa. La atenuación de un virus puede ser debida a una disminución del número de sus partículas o a un real cambio del mismo.

Por analogía con la valoración de las bacterias, dos procedimientos podemos emplear para titular un virus:

1.º La *lesión local,* que corresponde al recuento en placas; consiste en contar el número de lesiones producidas, y se basa en el procedimiento introducido por Holmes (5) en Virología, inoculando en las hojas del tabaco el virus del mosaico. A los virus animales, inoculables en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo, han aplicado también este procedimiento Woodruff y Goorpasture (6). Se puede emplear una fórmula matemática, recomendada por Youden, Beale y Guthrie (7) que da la relación entre el número de lesiones y el virus contenido en la cantidad inoculada:

$$y = N(1 - e^{-ax}). \text{ (*)}$$

2.º *Método de diluciones,* semejante al de Bacteriología, es el de más aplicación en el terreno de los virus. El material es inoculado en animales receptores a distintas diluciones. El resultado se expresa con el 100/100, el 50/100 ó el 0/100, según sean atacados el total, la mitad o ninguno. Para la titulación se utiliza siempre el 50 % que da una mayor exactitud.

La M. I. D. (mínima infectiva dosis) es la que produce síntomas en el 50 % de los animales inoculados. La M. L. D. (mínima letal dosis) es la menor cantidad de virus que produce la muerte en los animales inoculados. Cuando es el 50 % de muertes la cifra tope que empleamos para la valoración, se ha convenido en escribirla L. $D_{50}$.

Según Doerr (8) de cada dilución de virus debe de ser inoculado

(*) En esta fórmula $y$ representa el probable número de lesiones: $N$ = al máximo número de lesiones, $a$ = constante, $e$ = base logaritmos Neperianos.

un grupo de cinco animales, como mínimo. Nosotros empleamos seis ratones por dilución, que, por ser número par, simplifica el cálculo.

Para la titulación hemos tenido que utilizar un gran número de ratones blancos, comprados en lotes o nacidos en el Laboratorio, con la precaución de vigilar los animales durante un mes, antes de efectuar la inoculación, para evitar que estuviesen enfermos (especialmente de ectromelia). Todos los hemos elegido del mismo tiempo, del mismo peso y del mismo sexo, para efectuar las valoraciones con las máximas garantías. Una vez inoculados, se han puesto en grandes bocales de cristal, con tapas de rejilla. El cuidado y la alimentación han sido excelentes, y el examen, para ver si aparecía algún síntoma, se ha efectuado, por lo menos, dos veces al día.

Cuando se presentaban los síntomas característicos (retraimiento, tristeza y parálisis de alguna extremidad) se observaba casi constantemente al animal, para, en el momento de entrar en la agonía, sacrificarlo por sangría cardíaca y extraerle el cerebro, que conservamos en una mezcla a partes iguales de glicerina pura (30° Baumé) de pH mayor de 5,5, y tampón fosfatado (*), para trabajos ulteriores.

A la terminación de cada experimento se ha comprobado la inmunidad de los animales que sobreviven, por inoculación intracerebral de una gran dosis de virus.

El análisis de los resultados ha de hacerse por procedimientos estadísticos: primero se tabularán los fenómenos a investigar, y luego se aplicarán las fórmulas correspondientes.

Los puntos que generalmente se estudian son los siguientes:

*a*) Cálculo para la L. $D_{50}$ del 50 % exacto de defunciones, cuyo cálculo puede hacerse por interpolación entre las dos cifras de frecuencia que lo limitan. Read y Muench (9) han propuesto un procedimiento de sumas acumuladas, que simplifica mucho el trabajo y que es el que hemos empleado nosotros.

La exactitud del método la ha comprobado Horsfall (10) con el virus

(*) El tampón fosfatado se ha hecho mezclando 17,50 c. c. de una solución de difosfato de sosa cristalizado (166,42 × 1.000), 7,50 c. c. de una solución de monofosfato potásico (136,16 × 1.000) y 475 c. c. $H_2O$ destilada. Para más detalles véase la tesis doctoral de M. Alonso y el trabajo del mismo autor en Microbiología Española (mayo 1957, pág. 78) "Acción de los agentes químicos sobre los virus, etc."

de la gripe, obteniendo, en inoculaciones de grupos de cinco animales, desviaciones de ± 0.17 solamente, expresadas en términos de diluciones logarítmicas.

*b*) Se puede hacer también aplicación de la fórmula estadística de evaluación de recuentos bacterianos, que Parker (11) ha empleado en virus, la cual sirve para calcular la probabilidad $P$ a una dada concentración de virus $x$, del cual una cantidad $a$ se ha inoculado. Es una variación de la fórmula de Youden, Beale y Guthrie, que hemos citado anteriormente:

$$P = 1 - e^{-ax}$$

$e$ es la base de logaritmos Neperianos.

*c*) El intervalo entre la inoculación y la aparición de síntomas, o período de incubación, da una información complementaria para titular un virus, puesto que este período es más largo a menor virulencia. Según Briand y Beard (12) existe una relación lineal entre el logaritmo de la dilución y el período de incubación. Esta relación se podría expresar con la fórmula:

$$t_1 - t_2 = b\,(\log D_1 - \log D_2)$$

en que $t_1$ y $t_2$ corresponden a los períodos de incubación de dos diferentes diluciones: $D_1$ y $D_2$; $b$ es una constante, que mide la inclinación de la línea y que está en relación con la resistencia de los ratones o con la procedencia del virus.

Los métodos estadísticos que exponemos pueden ampliarse en los trabajos de Bonnier y Tedin (13) y con las teorías de Fischer (14).

## EXPERIMENTO N.º 1

Se han inoculado 36 ratones blancos de 15 gr. de peso, aproximadamente de dos meses, todos machos, con diluciones en progresión geométrica (escala logarítmica) del virus S. K. New Haven.

La masa encefálica recogida del segundo pase en ratones dado por el Dr. Gallardo, en un frasco estéril, con perlas de vidrio, es agitada fuertemente con solución salina, de la que ponemos 4,5 c. c. para con-

seguir una suspensión de virus 10—1, o sea al 1 × 10, que nos servirá de base para las otras diluciones.

La inoculación se hace con jeringuilla especial ($^1/_4$ c. c. dividido en centésimas) y aguja de inoculación en ratón. Se elige la vía frontal. La cantidad por inóculo ha sido 0,1 c. c.

Las diluciones de virus que utilizamos son del 1 × 10 al 1 × 1.000.000 ($10^{-1}$, $10^{-2}$, $10^{-3}$, $10^{-4}$, $10^{-5}$, $10^{-6}$), de cada una se inyectan seis ratones, que se separan en bocales y se rotulan. Cinco ratones, que mueren al hacer la inoculación, se eliminan.

A las veinticuatro horas, todos los animales están en perfectas condiciones. Los ratones de los seis grupos parecen normales.

A las cuarenta y ocho horas están en la agonía, casi muertos: uno del grupo 1.°, dos del grupo 2.° (sacamos los cerebros, previa sangría).

A las setenta y dos horas aparecen muertos: dos del 1.°, dos del 2.°, uno del 3.°, uno del 4.°

A las setenta y dos horas hay en la agonía: dos del 1.°, uno del 2.°, dos del 3.°, uno del 6.° (sacamos los cerebros previa sangría).

A las noventa y seis horas (cuatro días), están muertos: uno del 2.°, uno del 3.°

A las noventa y seis horas en la agonía: uno del 4.°, uno del 5.° (se sacan los cerebros).

A los cinco días, muertos: dos del 5.°, uno del 6.°

A los cinco días, en la agonía: uno del 1.°, uno del 3.° (el bazo está muy aumentado y en la nuca parece llevar una tumoración).

A los seis días, en la agonía: dos del 5.°, uno del 6.° (también con hipertrofia de bazo y tumoración en la nuca).

La tabulación de todos los ratones inoculados y los resultados obtenidos la podemos ver en las dos Tablas siguientes:

TABLA 1.

Ratones inoculados en la agonía o encontrados muertos. Cada grupo era de seis. Experimento número 1.

| Dilución | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | | 120 horas | | 144 horas | | Totales | | Total + | Sobreviven — |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M. | A. | M. | A. | M. | A. | M. | A. | M. | A. | M. | A. | | |
| $10^{-1}$ | » | 1 | 2 | 2 | » | » | » | 1 | » | » | 2 | 4 | 6 | 0 |
| $10^{-2}$ | » | 2 | 2 | 1 | 1 | » | » | » | » | » | 3 | 3 | 6 | 0 |
| $10^{-3}$ | » | » | 1 | 2 | 1 | » | » | 1 | » | » | 2 | 3 | 5 | 1 |
| $10^{-4}$ | » | » | 1 | » | » | 1 | » | » | » | » | 1 | 1 | 2 | 4 |
| $10^{-5}$ | » | » | » | » | » | 1 | 2 | » | » | 2 | 2 | 3 | 5 | 1 |
| $10^{-6}$ | » | » | » | 1 | » | » | 1 | » | » | 1 | 1 | 2 | 3 | 3 |
| Totales.. | » | 3 | 6 | 6 | 2 | 2 | 3 | 2 | » | 3 | 11 | 16 | 27 | 9 |

TABLA 2.

Resultado de la inoculación de diluciones de virus (progresión geométrica). Totales acumulados y porcentajes. Experimento número 1.

| Dilución | Número de ratones | Muertos | Agonía | Total + | Sobreviven | Totales acumulados + | Totales acumulados — | Por 100 + | Cerebros recogidos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-1}$ | 6 | 2 | 4 | 6 | 0 | 27 | 0 | 100 | 4 |
| $10^{-2}$ | 6 | 3 | 3 | 6 | 0 | 21 | 0 | 100 | 3 |
| $10^{-3}$ | 6 | 2 | 3 | 5 | 1 | *15* | *1* | 83,3 | 3 |
| $10^{-4}$ | 6 | 1 | 1 | 2 | 4 | *10* | *5* | 33,3 | 1 |
| $10^{-5}$ | 6 | 2 | 3 | 5 | 1 | 8 | 6 | 83,3 | 3 |
| $10^{-6}$ | 6 | 1 | 2 | 3 | 3 | 3 | 9 | 50 | 2 |
| Totales.. | 36 | 11 | 16 | 27 | 9 | | | 75 | 16 |

Vemos en la tabla número 1 que con la dilución de virus $10^{-3}$ ($1 \times 1.000$) han muerto cinco ratones del lote inoculado, más del 50 %, y con la dilución $10^{-4}$ ($1 \times 10.000$) han muerto sólo dos, menos del 50 %. Aparentemente la dilución exacta del virus que produzca el 50 % de letalidad, debe de estar situada entre ambas cifras. En la realidad matemática se desvía un poco, por la alteración del ritmo en las defunciones, que existe con las diluciones $10^{-5}$ y $10^{-6}$.

La suma de totales acumulados, que efectuamos en la tabla número 2, muestra que 15 ratones es el total + de la concentración mayor de virus, y uno el total —; para la concentración menor de virus encontramos 10 + y 5 —.

Aplicando la sencilla fórmula de Read y Muench, que también prefieren Lepine (15) y la mayoría de los virólogos

$$\frac{(A - B) \times (C + D)}{2\,(AD - BC)}$$

en que:

A = suma de animales + a la concentración más fuerte del virus.
B = suma de animales — a la concentración más fuerte del virus.
C = suma de animales + a la concentración más débil del virus.
D = suma de animales — a la concentración más débil de virus.

Y teniendo en cuenta que A = 15, B = 1, C = 10 y D = 5, obtendremos, al sustituir las letras por los números, la cifra que habrá que agregar al logaritmo de la dilución menor (concentración más fuerte del virus) para saber el *título* o cantidad exacta de dilución que contiene la dosis que mata a la mitad de los ratones inoculados o $L\,D_{50}$:

$$\frac{(15 - 1) \times (10 + 5)}{2\,(15 \times 6) - (10)} = \frac{210}{130} = 1{,}6$$

Agregando esta cifra al exponente de $10^{-3}$, tendremos como valoración o título:

$$LD_{50} = 10^{-4{,}6}$$

que significa que el virus S K New Haven que poseemos, diluído al $1 \times 60.000$, inoculado por vía frontal, dosis 0,1 c. c. mata al 50 % de los animales inoculados (ratones blancos, machos, de 15 gramos de peso y de dos meses de edad).

## EXPERIMENTO N.° 2.

Repetimos la inoculación de 30 ratones, que dividimos en cinco grupos de seis animales, uno para cada concentración de virus. Las diluciones se hacen, como en el experimento número 1, del $1 \times 10$ al $1 \times 100.000$, siguiendo una progresión geométrica. De cada una se inoculan seis ratones, de dos meses, aproximadamente, de 15 a 17 gramos

de peso y todos hombres. La dilución 1 × 1.000.000 no se efectúa en este experimento.

La cantidad de inóculo es 0,03 c. c., inyectado por vía lateral en el cerebro. Un pequeño mecanismo de madera, semejante a una guillotina, simplifica el trabajo.

Todos los animales están en perfectas condiciones, hasta las cuarenta y ocho horas.

Al tercer día: muertos, uno del grupo 1.º y uno del 2.º En la agonía, uno del 1.º, al que, previa sangría cardíaca, sacamos el cerebro.

Al quinto día: muertos, dos del 1.º, dos del 2.º y uno del 4.º En la agonía, uno del 2.º y dos del 3.º Sacamos también un cerebro, previa sangría cardíaca.

Al sexto día: muertos, uno del 1.º, dos del 2.º y dos del 3.º En la agonía, uno del 4.º, al que se saca también el cerebro.

Al séptimo día: muertos, uno del 1.º y uno del 5.º En la agonía, uno del 3.º

Al octavo día: en la agonía, uno del 4.º y uno del 5.º

Al noveno día: muerto, uno del 4.º

TABLA 3.

Ratones inoculados, en la agonía o encontrados muertos. Experimento número 2.

| Dilución | 3.º día | | 4.º día | | 5.º día | | 6.º día | | 7.º día | | 8.º día | | 9.º día | | Totales | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | M. | A. | M. | A. | M. | A. | M. | A. | M. | A. | M. | A. | M. | A. | + | — |
| $10^{-1}$ | 1 | 1 | » | » | 2 | » | 1 | » | 1 | » | » | » | » | » | 6 | 0 |
| $10^{-2}$ | 1 | » | » | » | 2 | 1 | 2 | » | » | » | » | » | » | » | 6 | 0 |
| $10^{-3}$ | » | » | » | » | » | 2 | 2 | » | » | 1 | » | » | » | » | 5 | 1 |
| $10^{-4}$ | » | » | » | » | 1 | » | » | 1 | » | » | » | 1 | 1 | » | 4 | 2 |
| $10^{-5}$ | » | » | » | » | » | » | » | » | 1 | » | » | 1 | » | » | 2 | 4 |
| Totales.. | 2 | 1 | » | » | 5 | 3 | 5 | 1 | 2 | 1 | » | 2 | 1 | » | 23 | 7 |

TABLA 4.

Resultado de la inoculación de diluciones de virus (progresión geométrica). Totales acumulados y porcentajes. Experimento número *2*.

| Dilución | Número de ratones por lote | Muertos | Agonía | Total + | Sobreviven — | Totales acumulados + | Totales acumulados — | Por 100 + | Cerebros recogidos |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $10^{-1}$ | 6 | 5 | 1 | 6 | 0 | 23 | 0 | 100 | 1 |
| $10^{-2}$ | 6 | 5 | 1 | 6 | 0 | ↑ 17 | 0 | 100 | 1 |
| $10^{-3}$ | 6 | 2 | 3 | 5 | 1 | 11 | 1 | 83,3 | » |
| $10^{-4}$ | 6 | 2 | 2 | 4 | 2 | *6* | *3* ↓ | 66,6 | 2 |
| $10^{-5}$ | 6 | 1 | 1 | 2 | 4 | *2* | *7* | 33,3 | » |
| Totales... | 30 | 15 | 8 | 23 | 7 | | | 76,66 | 4 |

En la tabla número 3 y en la tabla número 4 podemos ver que con la dilución $10^{-4}$, han muerto más de la mitad, y con la dilución $10^{-5}$, menos de la mitad. Las cifras de los totales acumulados son: A = 6, B = 3, C = 2, D = 7.

$$\frac{(6-3)\times(2+7)}{2(6\times 7)-(2\times 3)} = \frac{27}{72} = 0{,}37$$

Esta es la cifra que tenemos que agregar al exponente de la dilución $10^{-4}$ para obtener la concentración del virus que corresponde a la media dosis letal:

$$LD_{50} = 10^{-4{,}37}$$

O sea, que en este segundo experimento, en que hemos empleado la vía lateral intracerebral y la dosis de 0,03 c. c., la concentración de virus necesaria para producir la mitad de defunciones fué del $1 \times 37.000$.

Hemos utilizado también el procedimiento gráfico, colocando los totales acumulados, de ratones muertos por el virus (+) y ratones que sobreviven (—) después de inoculados, en papel semilogarítmico. El resultado, que coincide exactamente con la fórmula anterior, lo podemos comprobar en la gráfica del experimento número 2, que publicamos.

El promedio de logaritmo de los dos experimentos es igual a:

$$LD_{50} = 10^{-4{,}485 \pm 0{,}115}$$

Que significa, que una dilución del virus en 48.500 veces su volumen, es capaz de producir la muerte en la mitad de los animales inoculados (ratones blancos, de dos meses de edad, de 15 gr. de peso) por vía cerebral.

La dilución que produce estos efectos, puede variar en más o en menos, 0,115 del logaritmo, es decir, que oscila desde una concentración del virus al $1 \times 37.000$ hasta una concentración del $1 \times 60.000$, para obtener el mismo resultado:

$$(4{,}485 + 0{,}115 = 4{,}6 \quad \text{y} \quad 4{,}485 - 0{,}115 = 4{,}37)$$

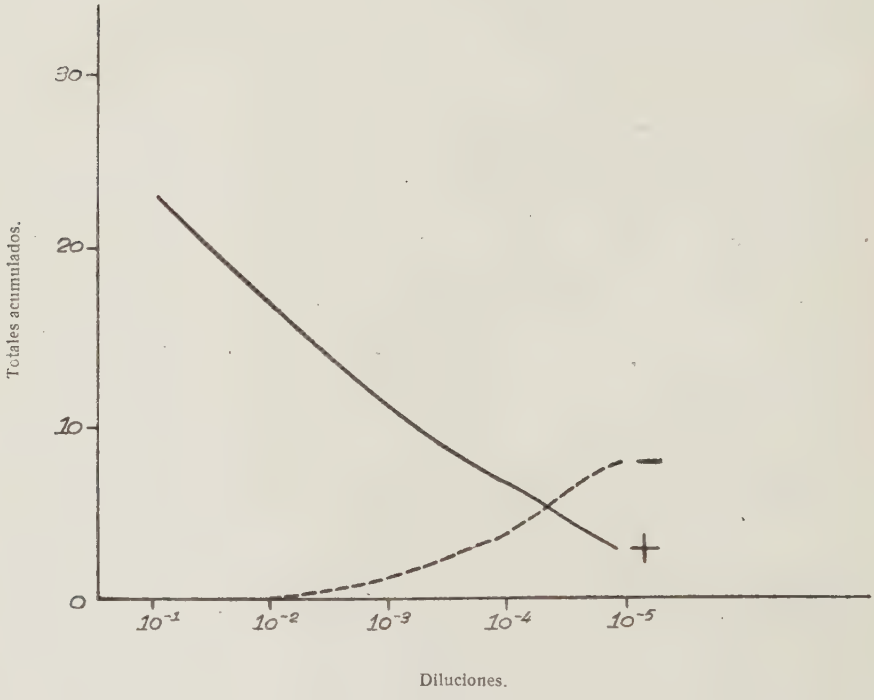


FIG. 1.

## CONCLUSIONES

1.° Hemos considerado de gran interés llevar a cabo la valoración del virus de la poliomielitis, cepa S. K. New Haven, antes de efectuar otros trabajos con dicho virus.

2.° Para ello hemos realizado dos experimentos en grupos de ratones (36 y 30, respectivamente), que hemos inoculado con diluciones diferentes, en progresión geométrica.

3.° Los resultados obtenidos, perfectamente armónicos, nos dan los títulos:

$$LD_{50} = 10^{-4,60} \quad \text{y} \quad LD_{50} = 10^{-4,37}$$

4.° El promedio de los experimentos es:

$$LD_{50} = 10^{-4,485 \pm 0,115}$$

5.° Podemos afirmar que este virus poliomielítico, adaptado al ratón por Jungeblut y conservado en el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología, del C. S. I. C., tiene un gran poder patógeno para este animal.

## RESUMEN

Se ha titulado el virus S. K. New Haven, adaptado por Jungeblut al ratón, que se conservaba en el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Se han empleado dos lotes de ratones blancos.

Los resultados de los dos experimentos han sido:

$$LD_{50} = 10^{-4,6} \quad \text{y} \quad LD_{50} = 10^{-4,37}$$

Podemos afirmar que tiene un gran poder patógeno para el ratón y que su valoración exacta es:

$$LD_{50} = 10^{-4,485 \pm 0,115}$$

## RESUME

L'auteur a titré le virus S. K. New Haven, adapté por Jungeblut a la souris, lequel est conservé à l'Institute "Jaime Ferrán", de Microbiología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid).

Il a employé deux lots de souris blanches.

Le resultat des deux experiences a été:

$$LD_{50} = 10^{-4,6} \quad \text{y} \quad LD_{50} = 10^{-4,37}$$

Nous pouvons affirmer que ce virus a un grand pouvoir pathogène pour les souris et que sa valeur exacte est:

$$LD_{50} = 10^{-4,485 \pm 0,115}$$

## SUMMARY

The author has made the titration of virus S. K. New Haven adapted by Jungeblut to mice, which is conserved in the Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid).

He has used two batches of white mice.

The result of the two experiments was the following:

$$LD_{50} = 10^{-4,6} \quad \text{y} \quad LD_{50} = 10^{-4,37}$$

We can certify that this virus has a great pathogenic power for mice and its exact value is:

$$LD_{50} = 10^{-4,485 \pm 0,115}$$

## ZUSAMMENFASSUNG

Der Bearbeiter hat den S. K. New Haven virus titriert welcher durch Jungeblut auf die Mäuse angewendet wurde und in Institut "Jaime Ferrán", de Microbiología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid), Konserviert ist.

Er hat zwei Serien weisser Mäuse verwendet.
Das resultat der zwei experimente war:

$$LD_{50} = 10^{-4,6} \quad \text{y} \quad LD_{50} = 10^{-4,37}$$

Wir Können bestätigen dass dieser virus eine gresse pathogene Kraft fur Mäuse hat und der gananuc Wert ist:

$$LD_{50} = 10^{-4,485 \pm 0,115}$$

## BIBLIOGRAFIA

(1) Jungeblut. Etudies in rodent poliomyelitis. Interference between murine and monkey poliomyelitis. J. Exp. Med. 76, 127 (1942).
Jungeblut. Transmission of a murine strain of poliomyelitis virus to guinea pigs and Rhesus monkeys. J. Am. Med. As. 116, 2136 (1941).
Jungeblut, Sanders. Studies of murine strain of poliomyelitis virus in cotton rats and white mice. J. Exp. Med. 72, 407 -1940).

(2) Sanz Ibáñez. Poliomielitis experimental. Trab. Inst. Cajal, 36 (1944).
Sanz Ibáñez. Adaptación del virus S. K. de Poliomielitis de lirón (Myuxus glis). Trab. Inst. Cajal, 38 (1946).
Sanz Ibáñez y Toledano. Ensayo de vacunación contra el virus Col. S. K. con vacuna específica preparada con virus purificado con metanol. Trab. Inst. Cajal, 43 (1951).

(3) Gallardo. Servicio de Virus del Instituto "Jaime Ferrán". Consejo Superior Invest. Cient. Madrid.
Gallardo. Concepto, caracteres generales e identificación de los virus. Rev. San. His. Pub. 21 (1947).

(4) Gard. Acta Medica Scandinavica. Supplementum CXLIII, pag. 41 The inmediate purpose of the experiments ist to find a methode for titration of the virus.
Gard. Purification of Poliomyelitis Viruses. Experiments on Murine and Human Strains. Uppsala 1943.
Gard. Encephalomyelitis of mice. A methode for the measurements of virus activity. J. Exp. Med. 72, 69 (1940).
Gard. Uebermikroskopische Beebachtungen an gereiningten Poliomyelitis-Viruspräparaten. Ein Beitrag zur Frage der Epidemiologie der Kinderlämung. Klin. Wschr. 1943.
Gard. Uebermikroskopische Beebachtungen an gereiningten Poliomyelitis-Viruspräparaten. Ein Vergleich mit den physikalisch-chemischen Versuchsergebnissen. Arch. Ges. Virusforsch. (1943.
Gard, Pedersen. Purification of the virus of mouse encephalomyelitis (Theiler's virus). Sciencie 94, 493 (1941).

(5) Holmes. Local lesions in tobaco mosaico. Bot. Gaz. 87, 39 (1939).

(6) Woodruff and Goodpasture. The susceptibility of the chorioallantoic membrane of chick embryos to infection with fowl-pox virus. Am. J. Path. 7, 20 (1931).
(7) Youden, Beale, Guthrie. Relation of virus concentration to the number of lesions produced. Cont. Boyce Thomson Inst. 7, 37 (1939).
(8) Doerr. Die Entwicklung der Virusforschung und ihre Problematik. Handbuch der Virusforschug. Springer, Wien (1938).
(9) Read and Muench. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. Am. J. Hyg. 27, 493 (1938).
(10) Horsfall. Neutralization of epidemic influenza virus. J. Exp. Med. 70, 209 (1939).
(11) Parker. Statistical studies of the nature of the infections units of vaccine virus. J. Exp. Med. 67, 725 (1938).
(12) Briand and Beard. Correlation of frecuencia of positive inoculation with incubation period and concentration of purified papilloma protein. J. Inf. Dis. 66, 245 (1940).
(13) Bonnier and Tedin. Biologisk variations analys. Stockolm, 1940.
(14) Fischer. Relationships of tonsillectomy and adenoidectomy to the incidence of poliomyelitis. Am. J. Dis. Chid. 61, 305 (1941).
(15) Lepine. Les Ultravirus. Bacteriologie Medicale por Dumas. París. 1951.
(16) Payne. Studies on Vaccination against Poliomyelitis with Live Virus Vaccines. Bul. Or. Mun. San. 16, 891-1082 (1957).
(17) Melnik and Opton. Assay of Poliomyelitis neutralizing Antibody in Disposable Plastic Panels. Bull. Or. Mun. San. 14,129-146 (1956).
(18) Barski et Leine. Recherche des anticorps neutralisants de la poliomyelite chez les africains (noirs et pygmeés) du Congo belge. Bull. Org. Mund. Santé 14, 118-128 (1956).
(19) Alonso, M.ª Luisa. Acción de los agentes químicos sobre los virus y experiencias con el antivariólico cultivado en huevos de gallina. Microbiología Española. Vol. 10. n.º 1, pág. 98 (1957).
(20) Poliomyelitis. Papers and Discussions Presented at the Second international Poliomyelitis Conference (1952).

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

# DETERMINACION DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO EN SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS CON VIRUS ANTIVARIOLICO

POR
María del Rosario de ZUAZO AGUIRRE

## DATOS GENERALES SOBRE INMUNIDAD RELACIONADOS CON NUESTRO TRABAJO

El estado de resistencia específica que los organismos poseen en contra de determinado agente patógeno, puede poseerlo desde su nacimiento como una característica de la especie zoológica de la que forma parte, o bien conseguirla a raíz de una infección espontánea (enfermedad de la que cura), o de una inoculación experimental o terapéutica (vacunación).

Las reacciones que se producen en estos dos casos dependen de la introducción en el organismo de sustancias heterogéneas aportadas por el agente productor de la enfermedad, o que se inocula; sustancias que se conocen con el nombre de antígenos. Estos, al ser introducidos a un organismo por vía parenteral, provocan la aparición de otras sustancias que reaccionan específicamente con ellos y que se denominan anticuerpos.

El término antígeno significa etimológicamente: anti = contra, gene = origen; es decir, que origina cuerpos contrarios, anticuerpos.

Las sustancias antigénicas, de acuerdo con los primeros conceptos, correspondían a las llamadas proteínas, señalándose a este respecto que algunas de ellas, carentes de núcleos aromáticos, no podían actuar en ese sentido; por ejemplo, la gelatina. Si una sustancia antígeno proteica era tratada por fermentos de digestión ácida: pepsina, o de digestión alcalina: tripsina, los productos de la degradación: peptosas y albumosas, dejaban de ser antígenos. La evidente relación entre la función antígeno y la composición proteica hizo que se señalaran, como carac-

terísticas de los antígenos, todas aquellas correspondientes a las proteínas.

El descubrimiento de ciertas sustancias glúcidas o lípidas obtenidas de los microbios o de los tejidos con características de antígenos, obligó a modificar el primitivo concepto que se tenía sobre estos elementos de que fueran exclusivamente proteicos. Así, una sustancia antígena puede adoptar el tipo químico de proteína simple (clara de huevo), de proteína conjugada (nucleoproteína), de proteína combinada (proteína y polisacáridos-mucinas, proteínas lípidos, lípidos con impurezas nitrogenadas, glúcidos con impurezas nitrogenadas), de ciertos glúcidos en función acetilada y de glúcidos en función fosfolípida (glúcido-lípido).

El término antígeno, que implica la propiedad o función de producir anticuerpos, presupone una acción *in vivo*. Con los antígenos comunes, la especie animal inyectada no modifica las características de éstos, de tal modo, que si inyectamos suero humano a un conejo, a un perro o a un caballo, estos tres animales dan anticuerpos antisuero humano, pero en otros casos, todas las especies animales no acusan el mismo comportamiento frente a un antígeno, recibiendo éstos el nombre de antígenos condicionados.

En condiciones normales, las proteínas homólogas, es decir, pertenecientes a la misma especie del organismo inyectado, no actúan como antígeno, cualquiera que fuere la vía de introducción; por el contrario, estas sustancias homólogas son reabsorbidas por completo sin provocar la formación de anticuerpos. Pero si se produce alguna ligera modificación química en ellas, pueden transformarse en antígenos.

Las proteínas heterólogas, es decir, pertenecientes a animales de otras especies, son capaces de provocar la aparición de anticuerpos.

La naturaleza química de los anticuerpos no ha sido determinada aún con precisión; se sostiene, sin embargo, que corresponden a las proteínas, pues muchas de sus propiedades están ligadas a las características físicas y químicas de estas sustancias.

Por intermedio del método de las precipitaciones fraccionadas se ha llegado a determinar su naturaleza de globulinas, desconociéndose si son en realidad las globulinas normales de los sueros, modificadas, o globulinas de nueva formación.

La inmunidad que se debe a la formación de anticuerpos en el medio interno del organismo, es estrictamente específica; es decir, que los

anticuerpos creados tienen una acción que se dirige exclusivamente hacia los antígenos que provocan su formación, a los que saturan o neutralizan, manifestándose *in vitro* por fenómenos físico-químicos y biológicos, como la aglutinación, precipitación y floculación, y por reacciones más complejas, como la bacteriolisis y la *fijación del complemento.*

Que los anticuerpos en forma de proteínas son las verdaderas sustancias inmunizantes específicas, se demuestra por la siguiente experiencia: si a un suero con anticuerpos específicos se le trata con una solución de sulfato amónico a saturación, se obtiene la precipitación de todas las proteínas que contiene, y con ella, la pérdida de sus propiedades específicas.

*Problemas de inmunidad en viruela-vacuna.*

Todas las dolencias del grupo varioloso son susceptibles de dar inmunidad cruzada, mas el grado de inmunidad varía mucho según la modalidad del virus usado para la inmunización y la especie animal en que se efectúa la experiencia.

En el hombre, tanto la viruela natural como la vacuna, determinan una inmunidad recíproca completa. Las antiguas experiencias de Jenner (1), Sacco (2) y Pearson (3) demuestran que la vacunación impide totalmente la variolización. Según Sacco, la inmunidad durante los cinco primeros días manifiéstase únicamente por la desaparición de la invasión general consecutiva a la variolización. A partir del quinto día, la reacción local es cada vez más atenuada y es completa el día doce. La vacunación de individuos atacados de viruela demuestra que la reacción es normal durante el período de incubación, mas disminuye rápidamente a partir de la iniciación de la dolencia y desaparece ya en el segundo o tercer día (Hugenin 4, Ricketts 5).

La inmunidad de la vacunación contra la viruela en el hombre es completa a partir del noveno día.

En los animales, la inmunidad recíproca es menos definida, pareciendo que en los macacos la vacuna da una protección más eficaz contra la vacuna, que la viruela contra la vacuna (Gordon, 6).

La duración de la inmunidad conferida por la vacunación no es ilimitada, como supuso Jenner; en todo caso, extiéndese en una media de cinco a diez años, si bien es excepcional que una inmunidad residual no

persista toda la vida, como lo demuestra la benignidad de la viruela cuando ella ataca a los individuos que fueron una vez vacunados después de la primera infancia.

La inmunidad antivariólica manifiéstase por un estado de alergia que determina una reacción inmediata a la inoculación de virus variólico o vacunal. Esta reacción inmediata, ya observada por Jenner, fué estudiada sistemáticamente por Pirquet (7) y más tarde, nuevamente, por Thiéche (8).

La inmunidad contra la vacuna manifiéstase también en los primeros momentos, por la aparición de sustancias virulicidas, cuyo título puede subir después de una vacunación normal hasta varias centenas, contra una dosis mínima virulenta (Eckstein, Herzberger 9). Estos anticuerpos virulicidas pueden obtenerse en mayor cantidad en animales hiperinmunizados. Ledinghan, Morgan y Petrie (10) usaron con éxito un suero así obtenido, en casos de encefalitis postvacunal. Mas, ciertamente, los anticuerpos virulicidas no explican por sí solos todo el proceso de la inmunidad antivacunal. En efecto, es posible obtener con virus muerto sueros fuertemente virulicidas, sin que exista un estado de inmunidad comparable a la dada por la infección con virus vivo (Levaditi y Sanchis Bayarri 11), Gordon (12) obtuvo inmunidad con un virus sometido a 55° C. durante treinta minutos, mas él mismo duda que todos los elementos del virus estuviesen muertos.

Levaditi y Nicolau emiten la hipótesis de que la inmunidad fuese celular y no humoral (13).

Cannes (14) sangró conejos vacunados, reemplazando su sangre con la de otros no inmunizados. Los conejos vacunados siguieron conservando su inmunidad. Según él, la inmunidad parece ser función del organismo y no de la sangre.

Resumir todas las teorías que se han emitido sobre la inmunidad antivacunal sería hacer un resumen de esa ciencia oscura, compleja y casi exclusivamente fenomenológica que tiene el nombre de inmunoquímica.

### *Formación de anticuerpos.*

Es un hecho comprobado que la inmunización va siempre acompañada de la formación de anticuerpos. Los primeros experimentos fueron,

desde luego, negativos. Freyer (15) logró inmunizaciones de terneras practicándoles la transfusión de unos 200 c. c. de sangre de otro animal vacunado, fracasando este método en niños. Straus, Chambon y Menard (16) practicaron la transfusión al séptimo día (6 a 7 litros de sangre), logrando así la inmunización de otras terneras. Sangre de animales ya inmunes resultó ineficaz. Los autores explican el primer fenómeno por la existencia de virus muy virulento en la sangre del animal dador. Ultimamente Urbani y Okawachi lograron en conejos, con sueros inmunes contra infecciones cutáneas aplicados por vía intravenosa, evidentes inmunizaciones. Haendel, Gildemeister y Schmitt dicen que basta un c. c. de suero para lograr inmunizaciones (17-18). Algunos autores definen la eficacia del suero por su contenido en anticuerpos virulicidas. Según Gordon (19), la fijación del complemento y la aglutinación son índices seguros para su valoración. Dejando reaccionar *in vitro* el suero de vacunados sobre virus activo, se ha podido observar y determinar su acción virulicida.

### *Anticuerpos virulicidas y neutralizantes.*

Sternberg (20), empleando una mezcla de vacuna con suero inmune, ha podido comprobar que el virus así tratado pierde su actividad. Los anticuerpos virulicidas se forman después de cada vacunación, en relación directa con la intensidad de la infección.

La virulicidad del suero animal es mucho más pronunciada que la del hombre, en el que se conserva débilmente durante mucho tiempo. Se supone que los anticuerpos quedan adheridos a los tejidos. Matsuda (21) ha podido demostrar, en sus experiencias, que los anticuerpos existentes en la sangre de conejos inmunizados se aumentan fuertemente por medio de una inyección de proteínas o de bacilos muertos (estafilococos, estreptococos, pneumococos, etc.).

La viruela confiere a la sangre humana fuertes propiedades virulicidas, que alcanza su máximun hacia el noventa día. Soluciones al 1/100 hasta 1/200 aún son eficaces. Parecen existir relaciones entre la gravedad del caso y la acción virulicida del suero.

La naturaleza y el mecanismo de la formación de estos anticuerpos nos son desconocidos. Es casi seguro que el suero ataca directamente al virus. Los anticuerpos se forman posiblemente en las lesiones, el híga-

do, bazo, cerebro, etc. El sistema retículo-endotelial tiene un papel especial en esta función y retiene al virus en su entrada a la sangre.

*Aglutinas y precipitinas.*

Tanto en el suero de los variolosos como en el de los vacunados, así como también en el de los animales de experimentación, se encuentran siempre estas sustancias. En el hombre se pueden ya apreciar a los diez o doce días, y se conservan durante unos seis meses. Después de las revacunaciones se presentan nuevamente y persisten dos o tres meses. Su acción es tan intensa que el fenómeno de aglutinación y precipitación puede observarse macroscópicamente. C. Russel, triturando y centrifugando la serosidad y costras de viruela con adición de solución salina, obtenía unos antígenos de color opalescente que en presencia de un suero varioloso daba lugar a una fuerte aglutinación (22). Gordon (23), por otra parte, ha señalado el fenómeno de floculación en los sueros variolosos o vacunales puestos en contacto con sus correspondientes antígenos. Tulloch (24) confirma igualmente que el suero de un conejo inoculado por vía intravenosa con virus variólico, adquiere precipitinas que se manifiestan al ponerse en contacto con una emulsión centrifugada de virus, o un extracto acuoso de costras variólicas.

*Sustancias fijadoras del complemento.*

Gastinel (25), en su notable tesis, afirma que estas sustancias aparecen en el suero de los variolosos y de los vacunados, antes que las virulicidas o neutralizantes; que tienen una duración limitada, pues desaparecen a los veinte días, coincidiendo con la fase evolutiva de la infección vacunal; que ello puede ser puesto igualmente en evidencia en las mismas condiciones en los animales vacunados por vías no tegumentarias.

Estas conclusiones se encuentran igualmente en trabajos ulteriores de Gordon, Thompson, Hasen y Buchbindes (26), Parker y Muckenfuss (27). Es de señalar que las reacciones de fijación de complemento pueden ser efectuadas utlizando como antígeno el virus vacunal obtenido por cultivo de tejidos. Finlaysen (28) empleó como antígeno una emulsión de corpúsculos elementales. Intoch ha estudiado el poder an-

tigénico de los corpúsculos elementales vacunales obtenidos por filtración y centrifugación fraccionada, consiguiendo reacciones de fijación muy precisas. (Congrés Inter. de Bactériol. agosto 1936.)

## TRABAJO EXPERIMENTAL

De las múltiples facetas que presenta el complejo proceso biológico de la inmunidad vacunal, sólo vamos a ocuparnos de la que se refiere a la presencia de anticuerpos fijadores de complemento en los sueros de los conejos inoculados con virus activos y atenuados de distintas procedencias.

Desde el primer momento encauzamos las experiencias a determinar aproximadamente: 1.°, cuándo aparecen en los sueros los anticuerpos fijadores del complemento; 2.°, su persistencia en los mismos; 3.°, relación entre el grado de infección y la formación de anticuerpos; 4.°, posible formación de los mismos en los conejos inoculados intradérmicamente con suspensiones de triturados de vísceras de otros animales (conejo) infectado con virus activo; 5.°, influencia del material utilizado en las inmunizaciones.

Para que todas estas experiencias puedan tener un positivo valor, nos fué indispensable preparar antígenos muy sensibles y numerosos sueros de conejos inmunizados con virus vacunal.

### *Preparación de antígenos.*

Los materiales utilizados fueron los siguientes: pulpa vacunal de ternera; testículos, pústulas de piel y cerebros de conejos; cerebros de ratón; embriones y membranas alantoideas de pollo.

Los testículos de conejo y los huevos de gallina incubados fueron infectados con filtrados de pulpa vacunal de ternera muy ricos en virus, y los cerebros de conejo y ratón con la cepa de neurovacuna Gallardo de 589 pases (29-30).

Los filtrados para las inoculaciones testiculares en conejos y en huevos de gallina incubados, los obtuvimos siguiendo la técnica de Monteiro y Godinho (31): "A 10 grs. de pulpa vacunal de ternera muy activa, triturados finamente en mortero con abrasivo, se añaden lentamente

100 c. c. de caldo glucosado al 1/100, perfectamente ajustado a pH 8. Esta suspensión se centrifuga durante diez minutos a 5.000 r. p. m., filtrándose seguidamente el líquido sobrenadante por bujía Mandler de poro regular". Comprobada la pureza y riqueza de virus del filtrado, se reparte en tubos o ampollas (4 c. c.) y se almacena en nevera de baja temperatura (— 15° ó 20° C.) para su posterior utilización, o se liofiliza.

*Antígeno de pulpa de ternera.*

Una cantidad determinada de pulpa de ternera, de comprobada actividad, se tritura finamente, incorporando poco a poco solución salina, en la proporción de 1/10. La suspensión así obtenida se centrifuga durante diez minutos a 2.500 r. p. m., y el líquido sobrenadante se centrifuga a su vez durante veinte minutos a 5.000 r. Separado el líquido de esta segunda centrifugación, se reparte en ampollas (1 c. c.) y se liofiliza para su conservación y utilización.

*Antígeno de testículo de conejo.*

Partimos del filtrado, rico en virus, de pulpa de ternera, del que inoculamos en masa testicular de un conejo de 2.400 gramos de peso, 0,50 c. c. La orquitis vacunal se manifestó al tercer día y al cuarto se sacrificó el animal y se extirpó el testículo. Con los testículos del cuarto y quinto pase, de aspecto hemorrágico, procedimos a la preparación del antígeno, previa comprobación de actividad y pureza bacteriana. Pesados los testículos, se pican finamente en placa de Petri, y el picadillo y serosidad se vierte cuidadosamente en mortero estéril con abrasivo, donde se trituran y añade solución salina en la proporción de 1/10. La suspensión así obtenida se centrifuga durante veinte minutos a 5.000 r. y el líquido sobrenadante una hora, a 10.000 r. El antígeno es el líquido sobrenadante de la segunda centrifugación, el que, repartido en ampollas de un c. c. y liofilizado, se almacena en nevera para posterior utilización.

*Antígeno de pústulas de piel de conejo.*

Varios conejos fueron inoculados por escarificación en piel (32), con una linfa dérmica de ternera de gran actividad. En la zona dorsal es-

carificada, que había sido previamente depilada con máquina y aseptizada mediante lavados jabonosos de borato fenil mercúrico al 1/5.000 y de solución salina, se presentó al cuarto día una erupción confluente de pústulas, que fueron arrancadas con cucharilla estéril. Pesada esta pulpa, se trituró en mortero con abrasivo, se la incorporó solución salina en la proporción de 1/10 y la suspensión se centrifugó una hora a 10.000 r. El líquido sobrenadante (antígeno) se repartió y almacenó como en los anteriores.

*Antígeno de neurovacuna no virulento (purificado).*

Con una suspensión al 1/1.000 de la cepa de neurovacuna ya indicada, inoculamos por vía intracerebral (0,20 c. c.) un conejo de 1.860 gramos de peso. Estando el animal paralítico y preagónico, se sacrificó por sangría total (cuarto día) y se extrajo el cerebro mediante craneotomía posterior, asépticamente practicada.. Comprobada pureza y actividad, se pesó el cerebro y se trituró en mortero sin abrasivo, incorporando lentamente agua bidestilada en la proporción de 1/20. Repartida la suspensión en ampollas de 40 c. c., a razón de 10 c. c. por cada una, se liofilizó durante diez horas y se cerraron y almacenaron en nevera. Seguidamente, a cada ampolla, con el material liofilizado, añadimos 20 c. c. de benceno y después de diez horas de contacto y repetidas agitaciones, filtramos por placa de Jena a vacío moderado, repitiendo esta operación dos veces más con un volumen de benceno (10 c. c.) y media hora de contacto. El sedimento libre de benceno por la filtración efectuada lo depositamos en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina (suficiente para empapar) durante una hora, lo trituramos finamente y añadimos solución salina hasta completar su volumen inicial. La suspensión así obtenida la centrifugamos durante cincuenta y cinco minutos a 10.000 r., y una vez repartida en ampollas de 1 y 2 c. c. se liofilizó para su mejor conservación.

La técnica descrita (33) es la que se usa para obtener antígenos de las encefalitis humanas y equinas, de las que tenemos gran experiencia, y que generalmente pueden ser diluídos en solución salina hasta el 1/4. Tomando como base estos conocimientos, utilizamos esta dilución en la vacuna para determinar el poder anticomplementario y su titulación. El

citado antígeno vacunal fué desechado por su bajo poder antigénico después de varias pruebas.

*Antígeno de neurovacuna virulento (soluble)*

Preparamos este antígeno al comprobar el bajo poder antigénico del anterior. Un cerebro de conejo infectado experimentalmente con neurovacuna, según la técnica corriente, lo trituramos en mortero sin abrasivo y después de comprobada pureza y actividad añadimos solución salina hasta lograr una suspensión al 1/10. Centrifugada la suspensión durante diez minutos a 2.000 r., y el líquido sobrenadante a 5.000 r., durante veinte minutos, lo repartimos en ampollas de 1 y 2 c. c. y una vez liofilizado lo almacenamos en fresquera de baja temperatura para su más perfecta conservación.

*Antígeno de cerebro virulento de ratón (soluble).*

Un grupo de ratones de 18 a 20 gramos de peso fueron inoculados intracerebralmente con 0,03 c. c. de una suspensión al 1/10 de neurovacuna de conejo previamente centrifugada durante diez minutos a 2.000 r. Los cerebros de los ratones sacrificados por sangría en fase agónica (comprobada pureza y actividad), fueron pesados y triturados en mortero con abrasivo hasta conseguir una papilla homogénea, a la que incorporamos solución salina en la proporción de 1/10. La suspensión así obtenida fué centrifugada durante diez minutos a 2.000 r. y el líquido sobrenadante se centrifugó, una parte (a), a 5.000 r. durante veinte minutos y el resto (b), a 10.000 r., una hora. Los líquidos sobrenadantes se reparten y conservan como los anteriores.

*Antígenos de tejidos embrionarios de huevos de gallina incubados.*

En la preparación de estos antígenos hemos utilizado siempre material embrionario procedente de huevos de gallina, de diez a doce días de incubación en estufa regulada a 38° - 38,5° C., con embriones de gran vitalidad. Los huevos se inocularon siguiendo la técnica de Cox (34), con 0,25 c. c. de nuestro filtrado de pulpa de ternera.

Para el examen y separación del material embrionario, se procede

del modo siguiente: Los huevos cuyos embriones aparecen muertos (vistos por transiluminación) al cuarto, quinto y sexto día después de haber sido inoculados, se abren asépticamente por la parte roma correspondiente a la cámara de aire, y una vez desprendido con unas pinzas finas el corion que forma la base de la misma y desgarrada la alantoides, se vierte el contenido del huevo en una placa de Petri, estéril, donde podremos apreciar las lesiones macroscópicas de la alantoides y el aspecto general del embrión. Si en el inmediato examen de frotis teñidos, de tejido alantoideo y embrionario, no se aprecian gérmenes bactéricos, se procede a la separación del material.

*Antígeno de embrión de pollo y alantoides.*

Recogidos los embriones sin cabeza y extremidades y las alantoides, se lavan varias veces con solución salina estéril y se trituran juntos en Turmix y nuevamente en mortero con abrasivo, hasta conseguir una pulpa fina. A un peso determinado de esta pulpa se añade lentamente solución salina, en la proporción de 1/10, centrifugando la suspensión resultante durante veinte minutos a 5.000 r. El líquido sobrenadante, que es el antígeno, se reparte en ampollas de 1 y 2 c. c., se liofiliza y se almacena en nevera de baja temperatura (35).

*Antígeno de alantoides.*

De contar con numerosas alantoides, el proceder más conveniente es seleccionar las que presenten mayor número de eflorescencias vacunales y obtener con ellas una pulpa, después de doble trituración en Turmix y mortero. Si no contamos más que con tres o cuatro alantoides, tendremos que hacer tan solo la trituración en mortero con abrasivo. De un modo o de otro, a la pulpa resultante se incorpora solución salina en la proporción de 1/5 y la suspensión obtenida, a una primera centrifugación a 5.000 r. durante veinte minutos, y al líquido sobrenadante a otra de una hora, a 10.000 r. El reparto, conservación y almacenamiento, como en los anteriores.

*Antígeno de embriones de pollo.*

Son recomendables los embriones correspondientes a las alantoides con numerosas lesiones. La trituración, suspensión salina y centrifugaciones, se efectúan en la forma indicada para el anterior. El reparto en ampollas, liofilización y almacenamiento, sin variaciones con lo repetidamente descrito.

Como puede verse en lo anteriormente expuesto, en la preparación de nuestros antígenos hemos utilizado distintos materiales de virus vacunal activo y distintas técnicas y pautas. Con ello trataremos de determinar posteriormente, en el curso de nuestras experiencias, los materiales, técnicas y pautas que nos proporcionaron mejores antígeno (36).

*Determinación del poder anticomplementario de los antígenos y titulación de los mismos* (*).

Se colocan dos filas de ocho tubos para cada antígeno y otra fila de tubos para los controles con solución salina. Se añade complemento previamente titulado, en cantidades de 0,05, 0,08, 0,10, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18 y 0,20 c. c. para cada serie de tubos. Se añade 0,20 c. c. del antígeno a probar a cada tubo en las dos series de tubos y 0,20 c. c. de solución salina en lugar de antígeno en la tercera serie. Una de las series se incuba en baño María a 37° C. una hora, junto con la que contiene solución salina, que actúa como control, y la otra se coloca en la nevera 16-18 horas. Después de la incubación a 37° C., una hora, y en la nevera 16-18 horas, se añade 0,40 c. c. de células sensibilizadas a cada tubo y éstos son incubados otra media hora a 37° C. Anotada la reacción se determina la cantidad menor de complemento diluído que dió hemolisis total. En nuestras determinaciones, los primeros tubos de cada serie, incluso los de control, presentaron fijaciones parciales, hecho debido a la cantidad insuficiente de complemento existente en tales tubos. Se indicará siempre la dilución del complemento utilizado.

(*) Al comenzar la exposición de nuestra labor práctica nos encontramos con el inconveniente de que habríamos de repetir monótonamente los cuadros sinópticos del experimento. Para no cansar al lector, creemos más acertado el exponer los cuadros-tipo, que dan idea perfecta de la marcha, seguida.

Significación de los números 0, 1, 2, 3, 4 y signos ±:

0 = hemolisis total.

±, 1, 2, 3 = grados intermedios de hemolisis.

4 = no hay hemolisis total.

La pauta seguida para la determinación del poder anticomplementario de los antígenos se recoge en el cuadro 1.

CUADRO 1.

Antígeno de pulpa vacunal de ternera.

| Tubos | Complemento al 1/30 — C. c. | Antígeno sin diluir — C. c. | Soluc. salina — C. c. | Mezcla hemolítica — C. c. | RESULTADOS | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Incubación en B. M. | | Incubación en nevera |
| | | | | | | *Control* | |
| 1 | 0,05 | 0,20 | 0,35 | 0,40 | 3 | 3 | 3 |
| 2 | 0,08 | 0,20 | 0,32 | 0,40 | 1 | 1 | 2 |
| 3 | 0,10 | 0,20 | 0,30 | 0,40 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0,12 | 0,20 | 0,28 | 0,40 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0,14 | 0,20 | 0,26 | 0,40 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0,16 | 0,20 | 0,24 | 0,40 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0,18 | 0,20 | 0,22 | 0,40 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,40 | 0 | 0 | 0 |

Título del complemento: 0,10 c. c.

Todos los antígenos resultaron sin poder anticomplementario, excepto el de cerebro virulento de ratón (soluble) en su porción *(a)*, que se desechó por este motivo.

Para la titulación de antígenos seguimos la misma pauta (cuadro 2),

CUADRO 2.

Antígeno de pulpa vacunal de ternera.

| Tubos | Complemento — C. c. | Diluciones previas de antígeno | Suero n.° 13 | Mezcla hemolítica — C. c. | Resultados | Control |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,20 | 1/2. 0,20 c. c. | 0,20 | 0,40 | 4 | 1 |
| 2 | 0,20 | 1/3 — | 0,20 | 0,40 | 4 | 1 |
| 3 | 0,20 | 1/4 — | 0,20 | 0,40 | 4 | ± |
| 4 | 0,20 | 1/5 — | 0,20 | 0,40 | 4 | ± |
| 5 | 0,20 | 1/6 — | 0,20 | 0,40 | 4 | 0 |
| 6 | 0,20 | 1/7 — | 0,20 | 0,40 | 2 | 0 |
| 7 | 0,20 | 1/8 — | 0,20 | 0,40 | 0 | 0 |
| 8 | 0,20 | 1/10 — | 0,20 | 0,40 | 0 | 0 |

Título del antígeno: 1/7.

CUADRO 3.

Titulación de antígenos.

| ANTIGENO | | Dilución del antígeno | Puro | 1/2 | 1/3 | 1/4 | 1/5 | 1/6 | 1/7 | 1/8 | TITULO DEL ANTIGENO |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Testículo de conejo | | Resultados.. | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 1 | ± | 1/6 |
| | | Control .... | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Pústulas de piel de conejo | | Resultados.. | 4 | 2 | 1 | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/2 |
| | | Control ... | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Neurovacuna avirulento (purificado) | | Resultados.. | 2 | 1 | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | Puro |
| | | Control ... | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Neurovacuna virulento (soluble) | | Resultados.. | 3 | 3 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/2 |
| | | Control ... | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Cerebro virulento de ratón (soluble) (a) | | Resultados.. | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1/5 |
| | | Control .... | 4 | 4 | 4 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | |
| Cerebro virulento de ratas (soluble) (b) | | Resultados.. | 3 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1/3 |
| | | Control ... | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Embrión de pollo y alantoides | | Resultados.. | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 1 | ± | 1/6 |
| | | Control .... | 1 | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Alantoides | | Resultados. | 4 | 4 | 4 | 3 | 3 | 2 | ± | 0 | 1/6 |
| | | Control ... | 2 | 1 | ± | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Embrión de pollo | | Resultados . | 4 | 3 | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 1/5 |
| | | Control .... | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |

que daremos a conocer en la titulación de los sueros, sustituyendo en ella el suero por el antígeno y éste por el suero. Varían igualmente las diluciones empleadas de título 1/80. Para la titulación utilizamos el suero inmune número 13.

De estos antígenos, dejaron de utilizarse, por su bajo título, los de pústulas de piel de conejo y de neurovacuna avirulento (purificado) y el de cerebro virulento de ratón (soluble) *(a)* por su poder anticomplementario.

La titulación de los antígenos es conveniente hacerla frente a un solo suero de buen título y repetidamente ensayado con varios antígenos. El suero número 13 utilizado por nosotros procedía de un conejo albino de 2.700 grs. de peso, inoculado con numerosas punturas intradérmicas de un triturado de membranas alantoideas, que dieron lugar a grandes lesiones. La sangría total, practicada a los veinticinco días, nos proporcionó suero suficiente para efectuar repetidos ensayos con la mayoría de nuestros antígenos y posteriormente para la titulación de los mismos.

*(Continuará.)*

*C. S. I C.*
*INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA*

# CONTROL MICROBIOLOGICO DE CONSERVAS VEGETALES

POR

PEDRO ALONSO CARRION

## INTRODUCCION

En la alimentación actual del hombre intervienen una serie de sustancias que pueden alterarse por la acción de diferentes agentes físicos, químicos o biológicos, los cuales rara vez actúan con independencia, sino más bien unidos o sucesivamente, lo que lleva consigo deterioros de índole muy compleja.

De todos los agentes que contribuyen a estropear los alimentos, son los biológicos, sin duda alguna, los más importantes, ya que los microorganismos no sólo pueden originar considerables perjuicios a la industria de la alimentación, sino incluso graves intoxicaciones a los consumidores de sus productos.

Las alteraciones biológicas de las sustancias alimenticias pueden responder a diferentes tipos. Así, en la descomposición de los alimentos que contienen abundantes carbohidratos se producen habitualmente diversas fermentaciones, casi siempre inofensivas, mientras que en la descomposición de los productos ricos en proteínas se originan putrefacciones, que, además de molestas, con frecuencia son peligrosas.

Los microorganismos responsables de estas alteraciones pueden ser saprofitos o patógenos, esporógenos o no esporógenos, mesófilos o termófilos y aerobios o anaerobios. Ahora bien, respecto a las condiciones necesarias para crecer y reproducirse, las bacterias son más exigentes que las levaduras o los mohos, lo que se traduce en que estos últimos microorganismos pueden desarrollarse en condiciones desfavorables para aquéllas, ya que las bacterias requieren, por regla general, cantidades

relativamente grandes de humedad, un pH próximo al punto neutro y determinadas presiones osmóticas, casi siempre bajas.

Los intentos realizados hasta la fecha para combatir las alteraciones e intoxicaciones alimenticias han sido muy numerosos, habiéndose logrado eficaces métodos de conservación, que, además de evitar el desarrollo de los gérmenes nocivos, permiten regular el comercio de determinados productos alimenticios.

La conservación de alimentos ha sido la base de florecientes industrias e instituciones dedicadas a la investigación, a las que muchas empresas dedican importantes inversiones de capital, siendo de gran interés para la economía de un país el poseer una poderosa industria conservera.

En el caso concreto de España, las conservas vegetales representan una fuente considerable de ingresos, tanto en pesetas como en divisas, y por ello todos los esfuerzos serán necesarios para mejorar y ampliar esta industria, sobre todo si queremos mantener un mercado internacional prestigioso.

Con el calor se puede lograr una esterilización completa del alimento o una "esterilización comercial", en la que los gérmenes que no mueren quedan incapacitados para multiplicarse. Las temperaturas excesivas, si bien destruyen a todos los microorganismos, tienen el inconveniente de originar alteraciones en el aspecto, sabor y composición de los alimentos, siendo, por tanto, necesario el empleo de determinadas temperaturas, con arreglo a la naturaleza de cada producto.

Los vegetales tienen la particularidad de presentar una rápida penetración térmica, pero, además, las bacterias sucumben con más facilidad en un medio ácido o alcalino que en otro neutro, lo que explica que las frutas y verduras se conserven con más facilidad que las carnes o el pescado.

De lo indicado anteriormente se deduce el interés que presenta la determinación de la temperatura y el lapso de tratamiento para cualquier producto alimenticio. En general, las formas vegetativas no esporógenas existentes en un medio líquido se destruyen a 60° C. durante sesenta minutos, o bien entre 70 y 80° C. en pocos minutos. Las esporas resisten estas temperaturas, pero perecen a 115° C. en treinta minutos, o a 120° C. durante quince minutos.

Otro factor a considerar es el pH del medio por su íntima relación

con la temperatura; así, para valores de 4,5 o inferiores es suficiente una temperatura de 87,8° C. —en el caso de las frutas que han sido previamente cocidas—, mientras que con valores de pH superiores se necesitan 93,3° C. para asegurar una suficiente eliminación de las bacterias fusiformes no esporuladas, ya que las especies anaerobias y esporuladas requieren temperaturas mucho más elevadas.

Con el fin de que los productos no se deterioren por la acción del calor, se procura reducir el tiempo del tratamiento térmico, siendo preferible una exposición prolongada a temperaturas relativamente bajas que un tratamiento breve, pero con más calor, sobre todo cuando se trata de conservas vegetales.

Aparte de los microorganismos saprofitos, que pueden originar graves trastornos a la industria conservera, existen otros gérmenes productores de enfermedades, que requieren una atención especial.

La causa principal de intoxicación por alimentos proviene de la ingestión de sustancias nutritivas contaminadas por bacterias patógenas o por sus productos de excreción, denominados toxinas, originándose como consecuencia enfermedades más o menos graves, que en algunos casos conducen incluso a la muerte.

Con este trabajo pretendemos realizar una serie de experiencias con muestras procedentes de diversas conservas vegetales normales y estropeadas, adquiridas al azar en el comercio, con el fin de poder controlar las condiciones higiénicas de fabricación, determinar las causas de alteración y descubrir los posibles orígenes de ciertas intoxicaciones humanas.

Ante la escasez de citas bibliográficas españolas recurrimos a recopilar las más importantes referencias existentes en la literatura científica de otros países, seleccionando técnicas, medios de cultivo, reacciones bioquímicas, etc., etc, y establecemos como consecuencia una Guía de Trabajo para el laboratorio, que seguiremos en todas nuestras investigaciones.

Queda patente que el objeto del presente trabajo es conocer el estado microbiológico de las principales conservas vegetales españolas y establecer unas normas para su control, por lo que nos ocuparemos de la investigación de los posibles microorganismos causantes de alteración y la de aquellos otros que pueden producir intoxicaciones alimenticias.

Esperamos dar una visión general y unas conclusiones interesantes

para el estudio microbiológico de las conservas vegetales, productos éstos que cada día adquieren más preponderancia en el mercado de las sustancias alimenticias conservadas.

## ANTECEDENTES BIBLIOGRAFICOS

### Principales microorganismos que pueden causar alteración en las conservas vegetales

La alteración microbiana de los alimentos conservados por el calor se debe a la actividad de los microorganismos, los cuales pueden sobrevivir al proceso de calentamiento o penetrar en los envases, a través de sus fisuras, después del proceso térmico. En ciertos alimentos enlatados es posible, con un conocimiento de las características del envase y naturaleza de los alimentos, predecir el tipo de microorganismo responsable de las alteraciones. Tales predicciones son posibles como resultado de los conocimientos acumulados sobre la resistencia al calor, actividades biológicas y otras características de los diferentes tipos de gérmenes, los cuales, por otro lado, están asociados a diversos materiales crudos.

Existen microorganismos que se pueden predecir por la naturaleza del alimento, en tanto que otros no pueden pronosticarse por proceder del agua, del aire, o del suelo.

Los norteamericanos nos han demostrado como las alteraciones de tipo microbiológico están relacionadas con la acidez de los alimentos, por lo que Bigelow (1) y Camerón (2) (3) (4) (5) propusieron la siguiente clasificación de los alimentos conservados según su pH:

| | |
|---|---|
| Alimentos no ácidos | : pH superior a 6.0 |
| Alimentos semi-ácidos | : pH entre 4.5 y 6.0 |
| Alimentos ácidos | : pH inferior a 4.5 |

Camerón y Esty (6) han sugerido modificaciones a esta clasificación, estableciendo en consecuencia cuatro grupos, a cada uno de los cuales le asignan determinados elementos:

Grupo 1.—Baja acidez (pH superior a 5.0). Productos cárneos, marinos, leche y ciertos vegetales.

Grupo 2.—Acidez media (pH 5.0 - 4.5). Mezclas de carne y vegetales, así como otras especialidades.

Grupo 3.—Acidez (pH 4.5 - 3.7). Tomates, peras, higos, piña y otros frutos.

Grupo 4.—Gran acidez (pH inferior a 3.7). En curtidos o escabeches, uvas, jugos cítricos y ruibarbo.

El *Clostridium botulinum,* agente peligroso de alteración, no resiste un pH inferior a 4.5, razón por la que si éste es superior al referido valor debe esterilizarse el producto a presión, con el fín de conseguir temperaturas superiores a los 100° C.

Baumgartner (7) (8) reduce todavía más esta última clasificación y establece dos amplios grupos, de los que nos ocuparemos a continuación:

I) *Alimentos de baja y media acidez* (pH superior a 4,5)

La causa de alteración de las conservas vegetales está íntimamente ligada a la presencia de microorganismos, y por tanto a la resistencia de estos gérmenes frente al calor.

Bigelow y Esty (9) observaron que ciertas estirpes sobrevivían a continuas ebulliciones en el jugo de diversos cereales con un pH 6.1 durante 24 horas.

Donk (10) informó sobre el tiempo de resistencia al calor de un organismo de "acidez plana", el cual resultó ser de 11 minutos a 120° C. con una acidez de pH 6.1, y otro microorganismo de este tipo, estudiado por Williams, Merrill y Cameron (11) sobrevivió 35 minutos a 120° C. en un tampón de pH 6.95.

a) *Bacterias termofílicas.*

La existencia de estos microorganismos se conoce a partir de 1905, pero sólo desde hace unos años, en que se reconoció su importancia como organismos deteriorantes de alimentos, han sido objeto de diferentes investigaciones bacteriológicas, las cuales hasta la fecha no han permitido establecer una clasificación completa de los mismos.

Las bacterias termofílicas presentan una temperatura óptima de 55° C., aunque sus límites, respecto al crecimiento, varían según los tipos; algu-

nos se desarrollan en la zona de los 25° C., mientras que otras lo hacen por encima de los 40° C. Las especies que se desarrollan por debajo de los 40° C. se denominan bacterias termofílicas facultativas, a diferencia de las termofílicas obligadas que dejan de crecer a la temperatura indicada.

Ahora bien, las especies termofílicas obligadas presentan una mayor resistencia al calor que las facultativas.

La resistencia al calor de las especies termofílicas es tan alta, que las temperaturas necesarias para su destrucción originan con frecuencia deterioros en las cualidades del alimento, consistiendo su control, fundamentalmente, en la total eliminación o reducción del grado de contaminación así como en el rápido enfriamiento de los envases. El almacenamiento de los productos contaminados deberá realizarse, por las razones expuestas, a bajas temperaturas.

Desde que se sospechó que las elevadas temperaturas podían originar alteraciones en los alimentos envasados, comenzaron a realizarse una serie de investigaciones en EE. UU. las cuales demostraron que, efectivamente, las altas temperaturas originaban dichas alteraciones debido al desarrollo de estos microorganismos termofílicos.

Hirst (12) encontró casos típicos de "acidez plana" en judías alteradas, pero estableció que dicha alteración no se presentaba frecuentemente debido a que las temperaturas de almacenaje suelen ser bajas. Estas especies termofílicas se han encontrado en diversos materiales, principalmente en diferentes tipos de suelos, azúcares y almidones.

La importancia de la contaminación termofílica no se debe solamente a la infección directa de los productos alimenticios, sino también a la procedente de las instalaciones, utensilios, etc., etc. donde estos microorganismos pueden proliferar y contaminar intensamente a las sustancias alimenticias durante su preparación y envasado. Como vehículo de infección para estos organismos destacan por su importancia los azúcares y los almidones.

La "National Canners Association Research Laboratories" de Norteamérica, ha establecido unos límites "standard" para la contaminación termofílica de ciertos productos alimenticios que pueden ser envasados (13).

Barton (14) en 1938, destaca como productos propicios para sufrir contaminaciones termofílicas fuertes a los azúcares, jarabes, harinas de maíz o cereales, harina de arroz y algunos hongos, los cuales se ha

demostrado que poseen una gran cantidad de esporas procedentes de bacterias de este tipo.

Existen tres grupos de gérmenes termofílicos, cada uno de los cuales es responsable de una típica alteración, por lo que seguidamente pasamos a su estudio:

1) *Grupo de las bacterias de acidez plana (Flat-sour).*—Los microorganismos anaerobios facultativos de este grupo se denominan así por atacar a los hidratos de carbono con producción de ácido láctico, fórmico o acético, pero nunca originan formación de gas. En consecuencia, las conservas vegetales alteradas por estos microorganismos no presentan jamás abombamientos, permaneciendo las tapas de los envases planas o cóncavas. Estos tipos, desde el punto de vista económico, son los más importantes agentes de alteración, ya que la amplitud de su temperatura les hace ser los más peligrosos entre los microorganismos termofílicos. Pueden crecer a 37° C., y escasas especies se desarrollan lentamente a temperaturas que oscilan alrededor de los 25° C., siendo por tanto organismos termofílicos facultativos. Los productos contaminados por estos gérmenes, al almacenarse durante largos períodos de tiempo a elevadas temperaturas, pueden mostrar acidificaciones, pero nunca desprendimiento de gas. Las cremas, sopas y productos similares que contienen almidón, como necesitan un mínimo de calentamiento, son las más apropiadas para sufrir este tipo de alteración.

La especie tipo de este grupo es el *Bacillus stearthermophilus,* el cual fué descrito por Donk en 1920 (10).

Se trata de un bacilo curvado, de 0.8 × 3.5 μ, normalmente aislado, a veces en parejas o cadenas de tres a cuatro células y con los extremos redondeados, siendo, además, Gram negativo. Sus esporas son ovoides y terminales, de 1.0 a 1.5 μ. La temperatura óptima de crecimiento es de 50 ó 55° C. aerobio o anaerobio facultativo, habiendo sido aislado de conservas alteradas de diversos cereales así como de judías enlatadas. Se encuentra en el suelo, en el aire y en el polvo.

Aunque la mayor parte de los alimentos de acidez media pueden ser afectados por este microorganismo, aquellos que contienen almidones o azúcares son los más apropiados para sufrir este tipo de alteración.

2) *Grupo de las bacterias anaerobias sacarolíticas.* — Próximo en importancia al grupo anterior se encuentra el de otras bacterias termo-

fílicas, pero anaerobias estrictas, entre las cuales destaca el *Clostridium thermosaccharolyticum* de McClung (15).

Es éste un bacilo de 0.4 — 0.7 × 3.5 — 7.5 μ delgado, granuloso, que se presenta aislado o en parejas, pero no en cadenas, y Gram positivo. Sus esporas son esféricas, terminales e hinchadas. Su temperatura óptima es de 55 a 62° C., y respecto al oxígeno del aire es un anaerobio estricto, habiendo sido aislado de los hinchamientos que presentan los productos enlatados, así como del suelo.

Todos los microorganismo de este grupo son marcadamente sacarolíticos, produciendo grandes cantidades de gas a partir de los carbohidratos, principalmente dióxidos de carbono e hidrógeno, por lo que sus alteraciones originan abombamientos en las tapas de los envases. Un típico olor o sabor a ácido butírico acompaña frecuentemente a estos deterioros, y las proteínas nunca sufren alteración alguna.

Cameron y Esty (6) consideran a estos organismos, en los productos de moderada acidez, como los agentes de alteración más importantes, mucho más que los de la "acidez plana". Ahora bien, la amplitud de temperatura para los sacarolíticos anaerobios es también más estrecha que la correspondiente a las especies del tipo de "acidez plana".

De los cultivos examinados por McClung (15), en 1935, solamente uno mostró un ligero crecimiento después de 30 días de incubación a 30° C.

Los miembros de este grupo no son generalmente responsables de las alteraciones en los países fríos o templados, ya que las temperaturas de almacenamiento no favorecen su desarrollo, aunque, no obstante, pueden originar graves perjuicios en los productos exportados a países tropicales o muy cálidos, como han podido comprobar ciertas industrias conserveras inglesas y norteamericanas.

3) *Grupo de las bacterias anaerobias productoras de* $SH_2$.—Estas bacterias son las responsables del denominado "olor sulfuroso", cuya presencia es señal de alteración en los alimentos conservados.

La especie tipo del grupo es el *Clostridium nigrificans* de Werkman y Weaver (16).

Este microorganismo es un bacilo de 0.2 — 0.5 × 3.0 — 6.0 μ con los extremos redondeados y Gram positivo. Sus esporas ovales y subterminales están ligeramente hinchadas. Le caracteriza el producir sulfhídrico a partir de la cisteína y el ser un sacarolítico débil. La tempe-

ratura óptima de crecimiento es de 55° C., y respecto a las necesidades de oxígeno es anaerobio. Ha sido aislado del maíz enlatado, cuando éste presenta el típico "olor sulfuroso" de alteración y ocasionalmente también del suelo.

Los envases que contienen alimentos contaminados por este microorganismo permanecen frecuentemente planos en sus bases, debido a que el $SH_2$ que se origina es soluble en el contenido del recipiente, pero se tornan negros como consecuencia de la reacción que tiene lugar entre el compuesto sulfurado y el hierro que contiene el envase. Las alteraciones de este tipo son poco frecuentes, afortunadamente.

Además de las especies anteriores, también se pueden aislar, de las conservas alimenticias, otras bacterias termofílicas.

Tidel'Skaya (17) encontró un nuevo aerobio termofílico, al que denominó "*Clostridium thermofermentans*". Este microorganismo fué aislado de un puré de berenjena enlatado, tratándose de un anerobio obligado, que a la vez es sacarolítico y proteolítico.

Emel'Eyanchik y Borisova (18), en 1941, aislaron, de alimentos conservados, diversos microorganismos, los cuales se desarrollaban entre 37 y 68° C., con una temperatura óptima de 60 a 64° C. Estos organismos eran sacarolíticos, extremadamente resistentes al calor y difíciles de cultivar en los medios artificiales, no pudiendo detectarse su presencia por los métodos "standard" establecidos.

Se ha descubierto la presencia de algunas especies anaerobias en los alimentos conservados, las cuales parecen requerir la presencia de un 10 % de dióxido de carbono en su atmósfera, para poder realizar con ellas sucesivos cultivos en medios sólidos. Estos microorganismos causan ligeros abombamientos y acidificaciones en los productos en que se desarrollan.

Otros organismos termofílicos, aislados igualmente de conservas alteradas, son del tipo ácido-tolerante, como podremos ver al tratar de los productos ácidos.

b) *Bacterias mesofílicas.*

Próximos a las bacterias termofílicas se encuentran los gérmenes mesofílicos esporulados, de cuyo estudio nos ocuparemos seguidamente.

1) *Grupo de las bacterias anaerobias esporógenas.*—La temperatura óptima de crecimiento para la mayor parte de las especies de este grupo

es de 37° C., pero muchas crecen a 20° C. o temperaturas inferiores, mientras que otras pocas pueden crecer a 50° C. o temperaturas superiores.

Aunque la clasificación de estos microorganismos está basada principalmente en las características morfológicas, existe un tipo proteolítico o putrefactivo, en el cual se incluyen al *Clostridium botulinum, Cl. sporogenes* y *Cl. bifermentans,* y otro tipo sacarolítico representado por el *Cl. butyricum, Cl. pasteurianum* y *Cl. welchii,* según su especial habilidad para atacar a las proteínas o a los hidratos de carbono.

La importancia de estos microorganismos, como agentes de alteración, está relacionada con la naturaleza del alimento de que se trate, pues parece ser que para los productos de poca y media acidez los más importantes pertenecen al tipo putrefactivo.

El *Clostridium botulinum,* microorganismo patógeno, del que trataremos más adelante, no resiste la acción del calor, lo que le diferencia del *Clostridium sporogenes,* que sí es resistente.

Un organismo de este grupo, estudiado por Townsend, Esty y Baselt (19), sobrevivió durante treinta y cinco minutos a 110° C., empleando una solución tampón de fosfatos a pH 7.0.

Baumgartner y Wallace (7) aislaron una estirpe, estrechamente ligada al *Cl. sporogenes,* la cual permanecía viva después de treinta minutos de calentamiento a 115° C., pero siempre que se utilizase una solución tampón de 7.0 de pH.

Entre los anaerobios putrefactivos, los microorganismos del tipo *Cl. sporogenes* parecen estar más estrechamente relacionados con las alteraciones de los alimentos enlatados.

Crossley (20), en 1941, observó que la especie *Cl. sporogenes* era la más importante, como agente de alteración, en las conservas de judías, guisantes y patatas, ya que los productos de tomate con poca acidez se alteran por el *Cl. butyricum.*

Las especies anaerobias putrefactivas pueden mostrar un desarrollo anormal, obteniéndose como resultado de ello una alteración no gaseosa en medios con pH 4.5 ó 5.0, ya que, generalmente, la alteración producida por las bacterias anaerobias putrefactivas es de tipo gaseoso y suele estar frecuentemente acompañada por una desintegración del alimento, así como por la producción de compuestos de mal olor, todos ellos característicos.

Los microorganismos de este grupo provienen, principalmente, del

suelo y de las excretas animales, lo que explica su amplia distribución en el polvo, agua y vegetales, siendo los responsables de considerables pérdidas en los vegetales y en sus conservas.

2) *Grupo de las bacterias aerobias esporógenas.*—Los microorganismos aerobios y esporulados del género *Bacillus*, se encuentran ampliamente distribuídos en la Naturaleza. Proceden del suelo y del agua, razón por la que se encuentran frecuentemente en el polvo, en el aire y en los materiales crudos utilizados para la elaboración de las conservas. La mayor parte de los microorganismos de este grupo presentan una temperatura óptima de crecimiento que oscila entre los 25 y los 37° C., pero algunas especies pueden desarrollarse a 50 ó 55° C.

Respecto a su relación con el oxígeno del aire algunos gérmenes son aerobios obligados, mientras que otros son anaerobios facultativos, no inhibiéndose su crecimiento por el vacío practicado en las latas de conservas.

En la literatura científica es frecuente encontrar que la resistencia al calor de los miembros de este grupo es menor que la de los anaerobios putrefactivos. No obstante, algunos aerobios esporulados, como las especies que han sido asociadas a la producción de malos sabores y alteraciones de ablandamiento o aguado, presentan una notable resistencia a su destrucción por el calor.

Se ha comprobado que la resistencia al calor de los aerobios esporulados es, aproximadamente, la misma que la de las especies anaerobias, sobre todo cuando éstas son putrefactivas.

Las bacterias aerobias y esporuladas no tienen gran importancia en las alteraciones de las conservas vegetales, ya que el vacío a que se someten los envases impide el desarrollo de estos gérmenes.

Generalmente, no producen gas a partir de los hidratos de carbono, pero algunas especies del género *Bacillus* pueden originar una alteración gaseosa en ciertos productos enlatados.

Michael y Tanner (21) han observado que la alteración gaseosa del maíz, o de diversos cereales conservados, puede ser originada por estos microorganismos, habiéndose señalado que el *Bacillus subtilis* produce gas en los guisantes.

Cameron, Esty y Williams (22) aislaron un bacilo esporulado y aerobio, que era responsable del ennegrecimiento de las remolachas enlatadas.

c) *Levaduras, mohos y bacterias no esporógenas.*

Exceptuando los deterioros que pueden producir estos microorganismos al penetrar a través de las fisuras en el contenido de los envases, las levaduras, mohos y bacterias no esporógenas, por su baja resistencia al calor, no tienen una significación importante en las alteraciones de las conservas vegetales de baja y media acidez.

II) *Alimentos ácidos* (pH inferior a 4.5).

En las alteraciones de estos alimentos intervienen diversos microorganismos, entre los que se encuentran las bacterias acidófilas no esporuladas y esporuladas, las levaduras y los mohos. En la mayoría de los casos, los organismos están controlados por la brevedad relativa de sus procesos térmicos, los cuales se realizan a temperaturas inferiores a los 100° C.

a) *Bacterias esporógenas.*

Townsend (23) ha descrito como anaerobios sacarolíticos, formadores de esporas, a diversos tipos de *Clostridium pasteurianum,* a los cuales hace responsables de la alteración gaseosa en las frutas y tomates conservados.

Speigelburg (24) observó también que en la alteración de la piña conservada intervienen anaerobios sacarolíticos, semejantes al *Cl. pasteurianum,* los cuales no presentan la tolerancia al calor y a la acidez de las estirpes de Townsend.

Otros organismos acidófilos, formadores de esporas, han sido descritos en Norteamérica como agentes de alteración de las conservas ácidas, encontrándose entre ellos el *Bacillus thermoacidulans,* con su gran variedad de cepas. Este microorganismo fué descrito primeramente por Berry (26) en 1933, siendo un germen termofílico con las características generales del grupo de la "acidez plana", pero con la particularidad de tolerar los ambientes ácidos, observándose un desarrollo abundante a pH inferior a 4.0, y ocasionalmente un ligero desarrollo a pH 3.0.

Este último microorganismo tiene una considerable importancia en la alteración del jugo de tomate conservado, ya que produce un mal olor y una acentuada acidez.

Berry indica cómo la temperatura óptima para el desarrollo de este mal olor suele ser la de 37° C.

De acuerdo con Pearce y Ruyle (27) el microorganismo citado puede sobrevivir a 100° C. durante treinta minutos, siendo capaz de soportar el proceso térmico de la conservación del jugo de tomate. Sin embargo, este organismo es considerablemente menos resistente que otros tipos de gérmenes termofílicos formadores de esporas.

En Norteamérica e Inglaterra no se ha observado alteración en los productos ácidos conservados por la acción de las bacterias formadoras de esporas.

Woerz y Lenane (28) han descrito un microorganismo termofílico y anaerobio como causante de alteración gaseosa en los tomates en conserva.

b) *Bacterias no esporógenas.*

En este grupo los microorganismos más representativos son las bacterias Gram positivas productoras de ácido láctico, incluyéndose en él formas cocáceas y bacilares, algunas de los cuales producen gas.

Estos microorganismos, que normalmente se desarrollan bajo una reducida tensión de oxígeno, están ampliamente distribuídos en la Naturaleza, siendo característica su asociación con los materiales vegetales en fermentación.

Algunos miembros de este grupo son de gran interés en diversos procesos industriales, tales como, por ejemplo, los de los encurtidos vegetales.

La formación de gas por la acción del *Lactobacillus lycopersici,* que el Bergey (29) señala como probable sinónimo del *Lactobacillus brevis,* es bien conocida como resultado de la fermentación vigorosa de la salsa de tomate y de otros productos similares.

Savage (30) (31) aisló una forma cocácea perteneciente al grupo láctico, que comprobó se trataba de un agente de alteración para los zumos ácidos procedentes de determinados frutos. Este microorganismo, *Leuconostoc pleofructi,* se caracteriza por formar a su alrededor una película gomosa cuando se encuentra en soluciones azucaradas, y fué también mencionado por Pederson (32) como causante de alteración en los productos del tomate.

Todos estos microorganismos, productores de ácido lácteo, están

controlados por el moderado tratamiento térmico a temperaturas inferiores a los 100° C.

c) *Levaduras.*

En las conservas vegetales las levaduras apenas si se desarrollan después del tratamiento térmico, excepto en los casos de procesos insuficientes de esterilización o en aquellos otros en que se presentan escapes en los envases.

Las levaduras originan fermentaciones en las salsas ácidas y productos similares que contienen ácidos, azúcares o sales, bien estando éstos solos o asociados a elementos conservadores.

d) *Mohos.*

Generalmente, los hongos no tienen interés como agentes de alteración para las conservas vegetales, pero existe una importante excepción a esta regla, la cual corresponde a la especie *Byssochlamys fulva.*

Este moho, descrito por Olliver y Smith (33), es un importante factor en la alteración de los frutos enlatados o embotellados.

Origina este microorganismo la total desintegración de los frutos, debido a la degradación del material pectínico, y a veces las latas contaminadas se hinchan debido a la producción de dióxido de carbono.

La temperatura óptima para el crecimiento del moho es la de 30° a 37° C., y en relación con otras especies es excepcionalmente resistente al calor.

Olliver y Smith establecieron que el moho sobrevive a una temperatura de 88° C. durante treinta minutos, y en experimentos llevados a cabo por Hirst y McMaster (34) sus esporas resistieron temperaturas de 100° C. durante dieciséis minutos.

Hull (35) informó que los frutos enlatados deben ser calentados a 87.7 — 90.5° C., con el fin de poder controlar a este moho.

El grado de ablandamiento de los frutos no está relacionado con la cantidad de micelio visible, ya que incluso se presenta la completa desintegración en aquellos casos en que el micelio no se detecta a simple vista. Otra de las características de esta especie es la de poder tolerar una baja tensión de oxígeno.

El *Byssochlamys fulva* está presente en los frutos del campo y pro-

cede probablemente del suelo, no habiéndose observado este moho en algunos países como, por ejemplo, en EE. UU.

Una especie de *Penicillum* anaerobio facultativo y notablemente resistente al calor, fué aislado por Williams, Cameron y Williams (36) en 1941, de moras enlatadas. En el jugo de las moras la muerte del esclerocio se consigue a 85° C. en treinta minutos, aunque generalmente son suficientes quince minutos a 81° C.

Este último moho tolera una baja tensión de oxígeno, y procede generalmente del suelo.

Hasta ahora sólo nos hemos referido a los principales microorganismos que tienen una notable significación como agentes alterantes de las conservas vegetales, no habiendo mencionado, por tanto, aquellos otros que pueden asociarse con los ya descritos cuando los envases presentan perforaciones, fisuras u otros tipos de aberturas externas, pues, además de responder a los más variados tipos carecen de interés como gérmenes causales de alteración.

## Principales microorganismos causales de intoxicaciones alimenticias.

Antes de que fuese reconocido el verdadero papel de las bacterias en las intoxicaciones alimenticias se atribuían las enfermedades provocadas por el consumo de alimentos a la presencia de ptomainas que, según la opinión general de entonces, se formaban como consecuencia de la descomposición bacteriana de las proteínas.

Esta teoría es hoy en día insostenible, puesto que se ha demostrado que antes de formarse estas aminas tóxicas, el alimento alcanza un estado de putrefacción tal que resulta repugnante para el consumo humano.

Se ha comprobado que estos productos de la degradación proteínica son tóxicos, pero solamente cuando se ensayan en cantidades mucho mayores de las que pudieran ingerirse bajo condiciones normales, no existiendo pruebas positivas en el sentido de que tales productos sean de por sí perjudiciales en las sustancias alimenticias, por lo que Tanner (37) (38) ha señalado que los "venenos pútridos" de los antiguos autores pueden ser considerados en la actualidad como toxinas proce-

dentes del *Clostridium botulinum,* o de otras diferentes especies de *Micrococcus* o *Salmonella.*

Las intoxicaciones alimenticias se originan como consecuencia del consumo de alimentos contaminados por ciertos microorganismos vivos, o bien por el empleo de alimentos en los que se desarrollaron las bacterias productoras de toxinas. En otras palabras, los envenenamientos alimenticios pueden ser debidos a una infeción o a una intoxicación.

En general, se admiten tres tipos de microorganismos como agentes principales de intoxicación alimenticia, siendo éstos el *Clostridium botulinum,* cuya toxina provoca la enfermedad conocida con el nombre de botulismo, y ciertos gérmenes de los géneros *Salmonella* y *Micrococcus,* los cuales originan enfermedades que se caracterizan por la producción de perturbaciones gastrointestinales agudas. Ahora bien, existen otros diversos organismos que se consideran igualmente como agentes responsables de intoxicación alimenticia. (39.)

Seguidamente nos ocuparemos de las más importantes intoxicaciones alimenticias, así como de los principales microorganismos que las provocan.

*Intoxicaciones por especies del género* Micrococcus.

Aun cuando la existencia de estos gérmenes se conoce desde el año 1894, su papel como agentes de intoxicación alimenticia se ha reconocido desde hace poco tiempo, relativamente.

Estos microorganismos son anaerobios facultativos, Gram positivos, inmóviles y no esporulados, por lo que se destruyen fácilmente mediante la acción del calor. Producen ácido, pero no gas, a partir de numerosos hidratos de carbono, y algunas capas tienen la particularidad de licuar la gelatina.

Se encuentran todos ellos ampliamente distribuidos en la Naturaleza, sobre todo en el aire y en el agua, pero su principal fuente radica en el cuerpo de los animales, en donde normalmente se alojan sobre la piel, así como en los aparatos respiratorio y digestivo.

Cuando se desarrollan en los productos alimenticios, ciertas capas elaboran una sustancia enterotóxica filtrable, la cual provoca trastornos intestinales agudos. Esta sustancia enterotóxica es distinta de las demás toxinas producidas por los microorganismos, y no parece ser una toxina verdadera, pues sus propiedades antigénicas son dudosas, existiendo algunas pruebas en el sentido de que se trata de un metabolito.

Una de las características de esta intoxicación en el hombre es el rápido desarrollo de la enfermedad a consecuencia de la ingestión de la enterotoxina, apareciendo los síntomas, en la mayoría de los casos, al cabo de dos o cuatro horas.

La enfermedad se caracteriza por náuseas, vómitos, diarrea y calambre abdominal, síntomas que, si bien pueden ser fuertes, desaparecen rápidamente una vez eliminada la tóxina del cuerpo.

De manera análoga a como ocurre con otras intoxicaciones, el alimento puede no presentar cambio alguno en su aspecto y sabor, siendo esto muy frecuente en aquellos alimentos que se han elaborado sin la intervención del calor, tales como ensaladas, helados, pasteles rellenos de crema, etc., etc., y si bien los microorganismos de que nos ocupamos pueden desarrollarse en casi todos los medios, la producción de enterotoxina no tiene lugar en todos los alimentos.

Segalove, Davison y Dack (40) han estudiado el crecimiento de estas especies en varias conservas alimenticias previamente inoculadas, eligiendo para sus experiencias espárragos, espinacas, judías verdes, melocotones, jugo de tomate, maíz y guisantes. El crecimiento máximo se observó en los guisantes y en el maíz, no presentándose crecimiento alguno en las conservas ácidas, tales como las de jugo de tomate y melocotón. En casi todos estos casos el desarrollo a 22° C. era superior al que tenía lugar a los 37° C., y aunque normalmente estos microorganismos son incapaces de fermentar los azúcares con producción de gas, se ha observado, no obstante, la formación de abombamiento en las latas de guisantes y maíz por la acción de estos gérmenes.

No pudiendo identificarse estos microorganismos por los métodos corrientes de trabajo, la mayor dificultad radica, por tanto, en la falta de una técnica apropiada y sencilla de laboratorio que permitiera demostrar la presencia de la enterotoxina.

Los animales corrientes de laboratorio no suelen reaccionar cuando se les administra la enterotoxina, a no ser que se trate de cantidades elevadas, habiéndose empleado gatos y cerdos jóvenes a los que se les inyecta intraperitonealmente la enterotoxina, pero hasta la fecha el empleo de hombres voluntarios parece ser la mejor prueba de que se dispone.

Haynes y Hucker (41) han estudiado 114 cepas de *Micrococcus*, llegando a la conclusión de que la producción de enterotoxina no es una característica de especie sino más bien de ciertas cepas.

Chapman (42) ha sugerido el empleo de la reacción de la coagulasa para investigar alimentos sospechosos, ya que casi todas las cepas que provocan intoxicaciones alimenticias la producen, insinuando que el método podría ser útil en las investigaciones epidemiológicas.

Evans, Buettner y Niven (43) dan las normas a seguir para la evaluación de la coagulosa en el estudio de los estafilococos asociados a los envenenamientos alimenticios.

Estas formas cocáceas son relativamente sensibles al calor, por lo que no constituyen ningún problema para la esterilización térmica de los productos enlatados, pero existe cierta controversia respecto a la termoestabilidad de la enterotoxina, por lo que se estima que los alimentos enlatados pueden actuar como vehículos de transmisión para las enfermedades estafilocócicas.

a) *Intoxicaciones por especies del género* Salmonella.

A las especies del género *Salmonella* se les han atribuído, durante mucho tiempo, fenómenos de intoxicación por ingestión de alimentos conservados, pero recientes investigaciones han demostrado que en el pasado se les achacaban a estos microorganismos injustificadamente muchos casos de intoxicación.

Estos gérmenes anaerobios facultativos son comúnmente móviles, aunque no todas las formas, Gram negativos y se presentan como bastoncitos no esporulados de termorresistencia baja. Una característica común a todos los miembros de este género es su incapacidad para fermentar a la lactosa o a la sacarosa, aunque, sin embargo, atacan la glucosa, maltosa, manita y otros hidrocarbonados, produciendo generalmente ácido y gas.

No son proteolíticos, y las especies que provocan intoxicaciones intervienen frecuentemente en las enfermedades del ganado vacuno y de cerda; las ratas y ratones son también susceptibles a ciertas *Salmonella,* pudiendo albergar los portadores humanos dichos organismos en sus intestinos.

El aspecto y sabor del alimento infectado pueden experimentar alteraciones, pero siempre son notablemente perceptibles por el consumidor.

Las especies del género *Salmonella* que con más frecuencia ocasionan intoxicaciones alimenticias son la *Salmonella typhimurium* y la *Salmonella enteritidis.*

La mayor parte de estos microorganismos presentan tales analogías en sus características antigénicas, que se necesitan pruebas de absorción de aglutininas para precisar la identificación.

Las *Salmonella* no producen exotoxinas solubles, aunque sí endotoxinas, por lo que cuando se ingieren estos organismos vivos se producen gastroenteritis agudas, en la mayoría de los casos, después de un período de incubación que oscila entre las doce y las veinticuatro horas. La intoxicación así provocada se caracteriza por náuseas, vómitos, diarrea, dolores abdominales y fiebre, pudiendo persistir la enfermedad durante varias semanas. La mortalidad suele ser muy baja, del uno al dos por ciento, en casi todos los países.

En la bibliografía existen muchas referencias contradictorias con respecto a la capacidad de estas especies para provocar intoxicaciones del tipo gastro-intestinal. La mayor parte de las discrepancias se deben al hecho de que diversos investigadores emplearon diferentes métodos de experimentación, pues mientras unos se basan en experiencias de nutrición animal otros lo hacen sobre las reacciones provocadas por la inyección del material de experimentación.

Dack (44), en 1943, asegura que la intoxicación por *Salmonella* se debe a la ingestión de los organismos vivos, ya que las toxinas no juegan ningún papel.

b) *Intoxicaciones por especies del género* Clostridium.

Dos importantes especies de este género producen efectos tóxicos al segregar toxinas solubles; se trata del *Clostridium botulinum* y del *Clostridium parabotulinum.*

Ahora bien, el principal microorganismo de este grupo es el *Clostridium botulinum,* que fué aislado por van Ermengem en 1897.

Se encuentra este bacilo ampliamente distribuído en la Naturaleza, habiendo sido aislado de suelos vírgenes y cultivados de todas las partes del mundo, así como, ocasionalmente, de las excretas de los animales que en ellos suelen pastar.

Se conocen cinco tipos de *Clostridium botulinum,* con arreglo a sus toxinas, que se designan con las letras A, B, C, D y E. Los tipos A, B, y E originan el botulismo en el hombre, y de todos estos tipos el A es el más frecuente, mientras que el tipo E se ha encontrado solamente en unos cuantos casos. Los cinco tipos son antigénicamente distintos, y la

antitoxina preparada contra uno es inactiva frente a las toxinas de los otros tipos.

Morfológicamente los tipos mencionados son más o menos similares, presentándose como bacilos Gram positivos, más bien algo grandes, con las esporas ovales y de mayor diámetro que el de los bacilos, razón por la que los deforman. Todos son móviles, pero existen ciertas diferencias respecto a sus reacciones bioquímicas.

El *Clostridium botulinum* es, por tanto, un bacilo de extremos redondeados: 0.5 a 0.8 × 3.0 a 8.0 $\mu$, el cual se presenta aislado, en parejas o formando cadenas más o menos cortas, y sus esporas ovales pueden ser centrales, subterminales e incluso terminales, determinando un ligero hinchamiento en el bacilo. Produce ácido y gas con la glucosa, levulosa, maltosa, dextrina, glicerol, adonitol o inositol. Su temperatura óptima de crecimiento es de 35 a 37° C. y respecto al oxígeno del aire se comporta como anaerobio.

Es patógeno para los animales, tanto por vía parenteral como oral, originando una potente exotoxina neurotóxica. Esta potente toxina soluble se neutraliza con la antitoxina del *Cl. parabotulinum* tipo B. Ahora bien, este bacilo no se multiplica en los animales de sangre caliente y actúa únicamente a través de la toxina que segrega durante su vida saprofita.

Dible (45) afirma que la mortalidad por botulismo es del 60 al 70 %, presentando síntomas sumamente característicos, tales como vómitos, estreñimiento, doble visión, sed y dificultad en tragar. Aparecen estos síntomas, generalmente, a las veinticuatro horas de la ingestión del alimento contaminado, pero el período de incubación puede durar setenta y dos e incluso más horas. La temperatura suele ser subnormal, y la administración de la antitoxina específica, después de presentarse los síntomas, no conduce a nada en la mayor parte de los casos.

Muchos animales son suceptibles a la toxina botulínica, por lo que ciertas enfermedades, tales como las intoxicaciones del ganado equino o vacuno por forrajes y el "cuello flexible" de las aves, son la consecuencia de la ingestión de piensos contaminados por el *Cl. botulinum*.

Entre los alimentos que pueden provocar el botulismo se encuentran, entre otros, las frutas y las verduras.

Generalmente, el alimento intoxicado por el *Cl. botulinum* muestra señales evidentes de alteración, como son el desprendimiento de gas, la

digestión y el olor a rancio, aunque existen muchas pruebas demostrativas de que la toxina puede formarse sin que el alimento se altere de manera apreciable, siendo interesante hacer constar que en los productos enlatados el crecimiento del *Clostridium botulinum* no se traduce siempre en la formación de abombamientos.

Los datos facilitados por Scott y Stewart (46), en 1944, son de gran interés para las conservas de verduras, ya que estos autores informan que en las conservas de zanahorias y remolacha, cuyas latas estaban barnizadas por dentro, el crecimiento del microorganismo y la producción de toxina se realizaba regularmente, pero no en el caso de utilizar latas sin barnizar. La inhibición del crecimiento en estas últimas latas se debe al estaño existente en disolución; la concentración necesaria para impedir el crecimiento varía según el tipo de verdura, siendo del orden de 150 p. p. m. en el caso de la remolacha y de 30 a 60 p. p. m. en el de la zanahoria.

Las esporas del *Clostridium botulinum* poseen una considerable resistencia al calor, habiéndose adoptado el tiempo necesario para su destrucción como una norma fundamental que hay que seguir en la elaboración de los productos alimenticios con pH superior a 4.5.

Esta norma se basa en la suposición de que el microorganismo es incapaz de crecer en medios que acusen una acidez más fuerte de la que le corresponde al pH 4.5, pero sin embargo, aunque sólo en algunos casos raros, se ha observado el crecimiento y la producción de toxinas en productos alimenticios, cuyo pH era inferior a 4.5, tales como en peras enlatadas, albaricoques en lata, salsa de tomate, salsa ají de tomate y cebolla y tomates verdes, siendo todos estos productos de elaboración casera, excepto la salsa de tomate. (47.)

La exotoxina del *Clostridium botulinum* es relativamente termolábil, necesitando una temperatura de 80 a 85° C., durante 15 a 30 minutos, para inactivar a la exotoxina de los tipos A. B. y C. Esta exotoxina se caracteriza por atravesar las paredes del estómago y de los intestinos sin alterarse, en lo cual difiere de la mayoria de las toxinas bacterianas.

c) *Intoxicaciones por estreptococos y otros microorganismos.*

En la bibliografía científica se encuentran con frecuencia referencias en las que se afirma que ciertos microorganismos pueden provocar intoxicaciones alimenticias, a pesar de estar considerados como no patógenos. En

la mayoría de los casos estas afirmaciones se basan en datos clínicos, ya que las pruebas bacteriológicas son poco convincentes. Ahora bien, los hallazgos de laboratorio facilitados por Dack (44) parecen justificar, en muchos casos, la inclusión de los estreptococos de tipo "alfa" en la lista de los agentes bacterianos que provocan intoxicaciones.

Estos microorganismos Gram positivos se presentan bajo la forma de cocos esferoidales u ovales, agrupados en cadenas más o menos cortas, y se caracterizan por no producir esporas. Fermentan numerosos hidratos de carbono, tales como glucosa, lactosa, sacarosa, salicina, etc., con la producción de ácido, pero no de gas. No licuan la gelatina y la mayor parte de ellos se destruyen a 60° C. durante treinta minutos. La temperatura óptima para el crecimiento de estos organismos es, generalmente, de 37° C., siendo respecto al oxígeno del aire anaerobios facultativos.

Normalmente constituyen una flora saprofita, pero algunos de ellos intervienen en algunas enfermedades, como las afecciones reumáticas y los abscesos dentales. Ahora bien, la indisposición causada por los estreptococos de tipo "alfa" suele ser leve, en comparación con la de otros tipos de intoxicaciones.

Según Dack, los filtrados procedentes de cultivos de estos gérmenes no producen efecto alguno, por lo que, al parecer, los organismos son incapaces de originar enfermedad mediante sus toxinas.

Además de los microorganismos anteriormente citados se registran otros gérmenes en la literatura científica como agentes de intoxicación alimenticia, pero que de por sí no suelen ser patógenos.

Jordan y Burrows (48) informan sobre el hecho de que varias bacterias, tales como la *Escherichia coli*, diversas especies del género *Proteus* y el *Aerobacter aerogenes*, que han perdido o que nunca tuvieron capacidad para producir toxinas gastrointestinales, la adquieren después de repetidos pases por medio de cultivos a base de almidón, y bajo una atmósfera que contenga un 20 % de anhídrido carbónico. Sin embargo, los hallazgos anteriores no han podido ser confirmados por Hunter y Dack (49).

La confusión reinante en relación con la importancia de estos últimos microorganismos se debe al empleo de diferentes métodos para determinar las sustancias tóxicas.

Todas las pruebas existentes hasta la fecha, respecto al papel que desempeñan estos últimos microorganismos en las intoxicaciones alimen-

ticias, son poco convincentes e inseguras, razón por la que el grupo a que nos referimos es el menos importante de los estudiados, sobre todo desde el punto de vista bacteriológico de las conservas vegetales.

Si consideramos todos los datos de que disponemos y la eficacia de las modernas técnicas de elaboración, queda bien patente la poca importancia que tienen las conservas alimenticias comerciales como factores de intoxicación, ya que muchos de los casos que se les atribuyen a los productos enlatados o embotellados están basados en hallazgos clínicos, pero casi nunca en las necesarias pruebas bacteriológicas.

Durante mucho tiempo, y aun hoy en día, ha existido cierto prejuicio contra el consumo de conservas alimenticias, pero es un hecho innegable que los alimentos enlatados son menos aptos para provocar intoxicaciones que los productos frescos, siempre y cuando se sigan las correctas normas de conservación.

Savage ha revisado el problema de las conservas alimenticias en relación con la salud, resumiendo todos los datos referentes a los casos de intoxicación y a los alimentos que las producen.

La intoxicación por estafilococos rara vez está relacionada con las conservas vegetales, ya que la baja resistencia al calor de estos microorganismos, unida al efecto destructor de la esterilización sobre la enterotoxina, hace que los estafilococos tengan teóricamente un papel insignificante en este aspecto. Sin embargo, si las especies de estafilococos o estreptococos penetran en los envases después de la esterilización, sin acompañamiento de bacterias productoras de gas, las latas no se abomban, por lo que al abrirlas el contenido puede presentar un aspecto normal, a pesar del abundante desarrollo microbiano, razón por la que estos microorganismos pueden tener importancia en relación con la intoxicación provocada por la ingestión de alimentos enlatados.

En muchos casos de intoxicación se sospecha enseguida de los alimentos enlatados, pero esta suposición se debe muchas veces a ignorancia o negligencia en el manejo de los productos una vez abiertas las latas. Por ello, cuando se trata de intoxicaciones provocadas por alimentos enlatados no se debe descartar la posibilidad de contaminaciones, debidas al consumo prolongado del contenido de la lata abierta.

Por último, conviene hacer constar que el consumo de ciertas conservas normales provoca enfermedades en aquellas personas hipersensibles a sus proteinas, si bien en las personas normales no producen

efecto alguno. Los síntomas de estas enfermedades pueden ser de carácter grave y, en muchos casos, se asemejan a los producidos por las intoxicaciones bacterianas, razón por la que es frecuente que se atribuyan erróneamente al mal estado de las conservas alimenticias.

Entre los alimentos vegetales que provocan enfermedades en estas personas hipersensibles se pueden citar, como más importantes, a los tomates y a las fresas, pero casi todos los alimentos ricos en proteinas pueden originar reacciones alérgicas en aquellas personas sensibles a las mismas.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales.

En la elección de las muestras seguimos el criterio de clasificación establecido por Baumgartner, que, como expusimos en la parte correspondiente a los Antecedentes Bibliográficos, atiende al pH de las sustancias alimenticias, razón por las que realizaremos nuestras experiencias con los siguientes materiales:

*Albaricoque*..... (Confitura.)
*Ciruela*..... (Confitura y al natural.)
*Guisantes*..... (Al natural.)
*Tomate*..... (Jugo, puré, salsa y al natural.)

### Medios de cultivo

En la bibliografía extranjera se mencionan una gran variedad de medios de cultivo para el examen microbiológico de las conservas vegetales.

Durante bastante tiempo se emplearon diversos medios especiales, preparados a partir del material alimenticio que se iba a examinar, pero muchos de ellos no son necesarios para la investigación de determinados microorganismos.

En la actualidad se admite que las necesidades nutritivas requeridas por las levaduras, bacterias y mohos —para su desarrollo y multiplicación—, pueden ser proporcionadas por unos cuantos medios de fácil

preparación en el laboratorio, aunque, como es lógico, estos medios sólo nos sirven para el aislamiento primario del organismo deteriorante, ya que su identificación completa lleva consigo el empleo de los medios "standard" utilizados para el estudio de los cultivos puros.

En el Anexo del presente trabajo describimos los medios de cultivo que hemos seleccionado para nuestras investigaciones, con arreglo al pH de la conserva vegetal objeto del examen.

## Guía de trabajo.

Después de realizar una revisión de las diversas técnicas que se citan en la bibliografía para el análisis microbiológico de las conservas vegetales, hemos elegido aquellas que estimamos más convenientes para nuestro cometido, las cuales, una vez ordenadas de manera sistemática, nos han llevado a establecer la presente Guía de Trabajo, a la que nos adaptaremos en todas nuestras experiencias de laboratorio (50), (51), (52), (53), (54), (55), (56), (57, (58) y (59).

### I) *Incubación preliminar de las muestras.*

*a)* Esta operación no se realiza si las latas están abombadas.

*b)* Para los productos de baja y media acidez (pH superior a 4.5) el tiempo necesario de incubación es de más de treinta días a 37° C.

*c)* En el caso de productos ácidos (pH inferior a 4.5) el tiempo necesario de incubación es de más de treinta días a 25° C.

Todas las muestras se inspeccionarán diariamente durante este período de incubación, con el fin de someterlas a examen cuando presenten signos externos de deterioro, enfriándolas a la temperatura ambiente antes del análisis microbiológico.

### II) *Examen exterior del envase.*

*a)* Se registran todos los defectos groseros, tales como salientes, abolladuras, etc., que puedan identificarse en el cuidadoso reconocimiento previo de la parte externa del envase. Después de quitar la etiqueta se anotan todas las anormalidades que se observen, como óxidos, agujeros, cierres impropios o junturas defectuosas.

Las señales dudosas serán registradas, igualmente, para el examen posterior de la lata vacía, con el fin de poder asociar estas anormalidades a los hallazgos bacteriológicos.

*b)* Las latas se clasifican como planas, estalladas, saltadas, de abombamiento suave o abombamiento duro, y en el caso de estar estas últimas abolladas se hará la correspondiente anotación.

### III) *Operaciones previas.*

a) *Envases normales.*—Se limpia la superficie de la lata que va a ser abierta, con agua y jabón, alcohol etílico de 95° o fenol al 5 %. Después se flamea, haciendo rotar la lata lentamente para distribuir homogéneamente el calor, continuando esta operación hasta que un típico chasquido, una sacudida o el combamiento de la tapa, nos indique una positiva presión en el envase, lo que significa que se ha alcanzado un calentamiento y esterilización suficiente. La tapa esterilizada se cubre con media placa Petri estéril.

Después de retirar esta media placa Petri se perfora la tapa esterilizada de la lata mediante un largo punzón de acero, previamente flameado. En el caso de que no se haya hecho el ensayo de vacío, habrá que esterilizar el aire que va a penetrar en el envase, lo cual se consigue dirigiendo la llama del mechero Bunsen al extremo del punzón.

b) *Envases abombados.*—En este caso hay que esterilizar la superficie que va a ser abierta con una solución de $Cl_2Hg$ al 1/1.000, durante unos pocos segundos, secándola finalmente con un paño o compresa estéril. También se puede limpiar completamente la tapa con alcohol etílico de 95°, dejándolo evaporar al aire. *Nunca flamear.* Después se cubre la tapa esterilizada con media placa Petri estéril.

Para abrir estas tapas deben guardarse algunas precauciones, con el fin de evitar que el contenido de la lata salte a presión sobre el operador. Una buena protección se consigue con el sistema de Cheftel (60), el cual consiste en el empleo de un embudo de vidrio estéril, de mayor diámetro que el de la lata, y cuyo tubo debe estar taponado con algodón hidrófilo, también estéril. El embudo invertido se coloca sobre la tapa estéril de la lata, haciendo pasar a través del algodón del tubo un punzón largo y fino, el cual se golpea por su otro extremo con un martillo hasta que atraviese la tapa de la lata. De esta manera, el embudo impide

que el contenido del recipiente salte sobre el operador, consiguiéndose así una perforación cómoda y sin peligro. El bote debe colocarse sobre una cubeta metálica poco profunda que contenga fenol al 5 %, para recibir cualquier material que gotee del embudo. Cuando la presión de la lata se iguala con la del medio se retira el sistema, practicándose entonces la abertura del recipiente y la toma de muestras como se indicará más adelante.

c) *Envases de vidrio.*—Para los recipientes de vidrio se seguirán las normas indicadas en el apartado X: "Examen de conservas en vidrio".

### IV) *Toma de muestras.*

a) *Productos sólidos.*—Se abre la lata con un adecuado abrelatas, previamente esterilizado a la llama, teniendo cuidado de no dañar las junturas.

Mediante un taladracorchos estéril, cuya parte superior debe estar taponada con algodón, se toman unos 10 gramos de la muestra, la cual se expulsa con la ayuda de una varilla en un matraz estéril de 200 ml. que contenga perlas de vidrio y 90 ml. de agua destilada estéril. A continuación se agita el matraz intensamente.

El inóculo debe ser tomado de la parte central del contenido, sobre todo para el ensayo de esterilidad, por ser esta parte la que menor tratamiento térmico recibe, y, por tanto, la zona más probable de estar contaminada, pero con el fin de obtener un valor medio, el taladracorchos se dirigirá vertical y oblicuamente en varias direcciones hasta hacer contacto con la pared de la lata, sobre todo por si está su contenido alterado en la parte más externa, debido a fisuras, perforaciones, escapes, etc.

b) *Productos líquidos, semisólidos o viscosos.*—Se abre la lata como se indica en la sección a) que precede. Mediante una pipeta estéril de 10 ml. se hace la toma del inóculo —en este caso no hay que diluirlo—, siguiendo las normas descritas en la sección anterior, cuando se trate de productos líquidos.

En el caso de productos semisólidos o viscosos se utiliza una varilla de vidrio estéril de 4 mm. de diámetro, uno de cuyos extremos debe estar taponado con algodón hidrófilo estéril.

c) *Productos sólidos y líquidos.*—En este caso las dos muestras,

parte sólida y parte líquida, se toman aparte, utilizando unas pinzas o espátulas estériles para la fracción sólida, siguiendo las correspondientes normas de las seciones a) y b), anteriormente expuestas.

Después de cada toma de muestras, las latas se cubren de nuevo con media placa Petri estéril.

V) *Siembras y temperaturas de incubación.*

Los correspondientes medios de cultivo, cuya composición y preparación están indicadas en el Anexo, se inoculan con 2 ó 5 ml. del inóculo por cada 10 ml. de medio, directamente en el caso de productos líquidos, o de la dilución correspondiente, en el caso de productos sólidos. Es decir, 2 ml. si el producto es líquido y 5 ml. de la dilución si el producto es sólido.

El *M. 1:* Glucosa-Triptona, se inocula directamente, y el crecimiento se manifiesta por la turbidez y abundante sedimento, no presentándose velo en superficie.

En el *M. 2:* Caldo glucosado-P. B. C., además de presentarse las manifestaciones anteriores de crecimiento, la acidez hace que vire el indicador del color púrpura al amarillo.

El *M. 3:* Agar-Glucosa-Triptona-P. B. C., se inocula cuando está fundido a 50 - 60° C., homogenizándolo por rotación, y seguidamente se tiende con él una placa Petri estéril. Las colonias que aparecen en su superficie presentan un centro opaco y están rodeadas por varias zonas concéntricas de color amarillo, debidas al viraje del indicador.

El *M. 4:* Maíz-Hígado, conviene calentarlo a vapor durante veinte minutos, antes de inocularlo, con el fin de eliminar la mayor parte del aire disuelto. A una temperatura de 50 -60° C. se realiza la siembra del producto y a continuación se estratifica con agar simple al 3 %, fundido y enfriado previamente a 45 - 50° C. En este medio el crecimiento se evidencia por la turbidez y aparición de burbujas de gas, las cuales rompen o levantan la capa superficial del medio así preparado. Se puede presentar igualmente digestión y cambios notables en el pH.

El *M. 5:* Agar-Sulfito-Triptona, se funde a vapor y se inocula a 50 - 60° C.; en este medio el crecimiento se hace patente por el ennegrecimiento que rodea a la típica colonia en forma de disco, pero en

él no hay formación de gas si la bacteria que investigamos es productora de $SH_2$.

Estos medios mencionados se incuban en estufa a una temperatura de 55° C., y todos ellos se inspeccionarán diariamente por la tendencia de los microorganismos termofílicos a la autoesterilización.

Los medios *M. 6:* Caldo-Hígado y *M. 7:* Caldo-Hígado en tubos Holl, deben ser regenerados a vapor durante veinte minutos, y una vez fríos se inoculan con los correspondientes materiales.

El *M. 6,* una vez sembrado, se cubre con agar simple estéril al 3 %, previamente fundido y enfriado a 45 - 50° C., manifestándose en él el crecimiento por la formación de gas, el cual hace que se rompa o levante la capa superior del medio, presentándose malos olores si los microorganismos anaerobios son del tipo putrefactivo.

El *M. 7* se inocula con pipeta Pasteur y se tapa con un capuchón de goma, incubándolo durante un período de cuatro días a 37° C., ya que lo que pretendemos con este medio es investigar la presencia de la toxina botulínica. Al cabo de este tiempo se filtra el cultivo y se administra por vía "per os" a un ratón o a un gato, a la dosis de un ml, o de 5 ml., respectivamente, para lo cual se coloca esta cantidad en el bebedero de la jaula. Los animales se observan durante cuarenta y ocho horas, y en caso positivo aparecerán los típicos síntomas de esta peligrosa intoxicación, tales como midriasis, disnea, parálisis de las extremidades, diarrea especial en el gato y, finalmente, la muerte por parálisis bulbar.

En el *M. 8:* Caldo glucosado, que se siembra directamente, el crecimiento se hace evidente por la turbidez, producción de velo o sedimento y por la posible formación de gas, según la naturaleza de los microorganismos que en este medio se desarrollen.

El *M. 9:* Agar-Caldo glucosado, se inocula directamente, una vez fundido y enfriado a 45° C., homogeneizándolo por rotación y seguidamente se tiende con él una placa Petri estéril. Sobre su superficie aparecerán las colonias de los gérmenes aerobios existentes en el material objeto del examen.

Los medios de cultivo *M. 6, M. 7, M. 8* y *M.9,* así como otro medio *M. 4,* ya descrito anteriormente, se incuban en estufa a la temperatura de 37° C.

Cuando va a ser utilizado el *M. 10:* Agar-Glucosa-Proteasa-Peptona-Ext.° de levadura, se mezcla el agar fundido con los nutrientes estériles y se inocula a la temperatura de 45 -50° C. La incubación se realiza a 55° C. y el crecimiento se pone de manifiesto por la formación de colonias en su interior, siendo éste un medio para el aislamiento de las bacterias anaerobias termofólicas del grupo de "acidez plana", procedente de productos muy ácidos.

El *M. 11:* Caldo glucosado-Jugo de tomate, se siembra directamente, manifestándose el crecimiento por la turbidez que originan en él las bacterias acidúricas.

El *M. 12:* Agar Caldo glucosado-Jugo de tomate, se inocula uña vez fundido y enfriado a 45° C., tendiéndose seguidamente una placa Petri estéril. Sobre su superficie aparecerán las diversas colonias de los microorganismos acidúricos existentes en el material que se examina. Estos dos últimos medios se incuban en estufa a la temperatura de 37° C.

Los medios *M. 13:* Extracto de malta y *M. 14:* Agar-Extracto de malta, se utilizan para el aislamiento de los mohos y de las levaduras, debiendo ser incubados en estufa a la temperatura de 25° C.

El *M. 15:* Caldo lacto-biliado con rojo neutro, es un medio de enriquecimiento para la investigación del grupo *Coli-Salmonella,* por lo que se incubará veinticuatro horas a 37° C. En este medio el crecimiento se hace patente por el viraje del indicador y por la producción de gas.

Finalmente, el *M. 16:* Agar lactosado-tornasolado nos sirve para aislar sobre su superficie los cultivos obtenidos con el *M. 15,* debiendo incubarse las placas, una vez preparadas, en una estufa a 37° C. durante veinticuatro horas. Como se trata de un medio diferencial, si las colonias que aparecen son rojas intensas es que corresponden al *Coli,* pero si están azuladas o débilmente teñidas de rojo, entonces es señal de que se trata de una especie perteneciente a la tribu *Salmonella.*

### VI) *Examen microscópico del contenido.*

Mediante un agitador estéril se remueve el contenido de la lata abierta, anotando cuantos datos organolépticos puedan apreciarse, tales como olor, color, desprendimiento de gases en el contenido, existencia

de porciones alteradas, zonas fluidificadas e incluso presencia de colonias o masas de carácter microbiano.

### VII) *Examen microscópico del contenido.*

Se realiza sobre los frotis o extensiones directas del contenido de la lata, los cuales se someten a una tinción simple con violeta de genciana, así como a los métodos de Gram, Wirtz o Dorner, y Albert o Neisser, según que queramos investigar morfología, coloración diferencial, esporas o corpúsculos metacromáticos.

Se anotan los resultados del examen y la morfología correspondiente.

En las extensiones directas del producto pueden encontrarse:

*a)* Bacterias procedentes de las materias primas o de los procesos de elaboración, lo que indica malas condiciones higiénicas de preparación.

*b)* Bacterias procedentes de filtraciones o perforaciones.

Estas bacterias pueden estar muertas o vivas, sirviéndonos los resultados obtenidos en los ensayos de cultivo como comprobantes de este examen.

La presencia de bacterias con resultados negativos de cultivo indica buena esterilización, aunque mala elaboración.

Si las latas alteradas presentan bacterias, pero sus cultivos dan resultados negativos, es señal de que estamos ante un proceso de autoesterilización, muy propio de los microorganismos termofílicos, aunque en este caso los organismos se tiñen poco o lo hacen de una manera desigual, presentando al mismo tiempo otros signos de degeneración.

No suelen obtenerse cultivos positivos a paritr de productos cuyos exámenes microscópicos directos son negativos, a no ser que estos productos contengan sustancias inhibidoras de crecimiento, tales como antisépticos, sales, azúcar, etc.

### VIII) *Determinación del pH del contenido.*

Esta determinación se realizará siempre que sea posible, pero sobre todo cuando se sospeche la presencia de microorganismos de la "acidez plana".

La determinación de la concentración de hidrogeniones se realizará con electrodo de vidrio y, en su defecto, con "papel indicador universal", si bien esta última investigación es menos exacta.

IX) *Examen del envase vacío.*

Finalmente, se vacía el recipiente, el cual, una vez lavado con agua, se seca. A continuación se examina cuidadosamente su interior, con el fin de observar posibles perforaciones, defectos de junturas y cierres, corrosiones, descoloraciones, óxidos y cualquier otro tipo de defectos, todos los cuales serán anotados para poder asociarlos a los hallazgos microbiológicos.

X) *Examen de conservas en vidrio.*

La toma de muestras en estos productos se simplifica notablemente, ya que la tapa metálica se desprende con facilidad, aunque deben tomarse las necesarias precauciones para neutralizar el vacío. Antes de perforar las tapas, éstas deben esterilizarse mediante flameo, y después ser retiradas con gran cuidado para evitar trastocar la arandela de goma, ya que la posición de ésta puede ser importante al juzgar los resultados del examen.

En esta investigación habrá que prestar una especial atención a determinados puntos por radicar en ellos muchas veces las causas principales de los escapes, origen de las alteraciones en los productos envasados en recipientes de vidrio. Estos puntos son los siguientes:

*a)* Defectos o desconchados en el borde de la boca del frasco, a los cuales se debe el que la arandela de goma no se asiente bien en el orificio del envase.

*b)* Colocación incorrecta de la funda de papel, de tal forma que sobresalga del borde de la boca del frasco, lo que impide que el aro de goma se encuentre bien colocado.

*c)* Aro de goma retorcido.

*d)* Perforación de la tapa de metal.

En todos estos casos se harán las correspondientes anotaciones.

*(Continuará.)*

## EL PREMIO «FRANCO», DE CIENCIAS

Se ha otorgado el Premio "Francisco Franco", de Ciencias, 1957, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, al trabajo "Investigaciones sobre el género *Rhizobium* y su importancia como fijador de nitrógeno en la Agricultura". Los autores del mismo son, el Prof. D. Lorenzo Vilas, como Director, y los Dres. D. Miguel Rubio Huertos, don Gregorio Fraile Ramos, D.ª Eulalia Cabezas de Herrera Sánchez y doña Genoveva Tejerina Domínguez, todos ellos miembros del Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, y de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

---

## CONGRESOS DE MICROBIOLOGIA EN MEJICO

El primer Congreso Latino-Americano y el segundo Mejicano, de Microbiología, organizado por la Asociación Mejicana de Microbiología, se celebrarán en la ciudad de Méjico, del 12 al 19 de octubre próximo.

El Comité organizador está constituído de la siguiente manera: Presidente, D. Gerardo Varela; Vicepresidentes, D. A. González Ochoa, D. A. Sánchez Marroquín y D. C. del Río Estrada; Secretario, don J. Sosa Martínez, y Tesorero, D. L. F. Bojalil. El español, el portugués y el inglés serán los idiomas oficiales del Congreso.

Para toda clase de informes, dirigirse al Secretario, Atlanta, 139, México, 18, D. F.

## ERRATA ADVERTIDA

Página 48 (Vol. 11, n.° 1). Pie de Graph 1.

| Dice | Debe decir |
|---|---|
| Fresh weight<br>○ 18 hrs<br>● 3 days<br>■ 20 days | Fresh weight<br>● 18 hrs<br>○ 3 days<br>■ 20 days |

Depósito legal, M. 702. 1958

Artes Gráficas REYES - Jerónima Llorente 15. - MADRID

## OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Cantinuadores de los "Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal". Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE "AULA DEI".—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de "Aula Dei", Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. I, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

Ejemplar, 40 pesetas. Suscripción, 120 pesetas.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO "A. J. CAVANILLES".—Publicación del Instituto "Antonio J. de Cavanilles".

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 pesetas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto "José Celestino Mutis".

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativo al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto "José Celestino Mutis".

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

---

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID - (ESPAÑA)

---

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA